

# **Bildgebende Massenspektrometrie: Apparative und präparative Entwicklung, sowie lateral hochauflösende Untersuchungen artifizierter und biologischer Proben**

**Inauguraldissertation zur Erlangung des Doktorgrades in den  
Naturwissenschaften**

**– Dr.rer.nat. –**

**im Fachbereich 08 - Biologie und Chemie**

**Institut für Anorganische und Analytische Chemie – Analytische Chemie**

**Erstgutachter: Herr Prof. Dr. Bernhard Spengler**

**Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. Holger Zorn**

**vorgelegt von Dipl. Biol.**

**Martin Köstler**

**Giessen, den 3. Dezember 2010**

Tue das, wodurch du würdig wirst, glücklich zu sein.

**I. Kant** (\*22. April 1724, †12. Februar 1804)

# Inhaltsverzeichnis

<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>VI</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>VII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>XI</b>
<b>1 Zusammenfassung</b>	<b>2</b>
<b>2 Summary</b>	<b>7</b>
<b>3 Einleitung</b>	<b>12</b>
3.1 Die funktionelle Bedeutung biologischer Komponenten im Kontext ihrer lokalen Organisation . . . . .	12
3.2 Optik . . . . .	14
3.2.1 Geometrische Optik . . . . .	14
3.3 Laserenergie und Laserfokusbereich . . . . .	18
3.3.1 Räumliche (laterale) Auflösung . . . . .	20
3.4 Massenspektrometrie . . . . .	20
3.4.1 Grundlegende Begriffe der Massenspektrometrie . . . . .	21
3.4.1.1 Massenauflösung . . . . .	21
3.4.1.2 Massengenauigkeit . . . . .	22
3.4.2 Grundzüge der Funktionsweise eines Massenspektrometers	23
3.4.3 Aufbau eines Massenspektrometers . . . . .	23
3.4.3.1 Ionenquellen . . . . .	25
3.4.4 Laser und lasergestützte Ionenerzeugung . . . . .	26
3.4.4.1 Laser Desorption/Ionisation (LDI) . . . . .	28
3.4.4.2 Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation (MALDI) . . . . .	29
3.4.4.3 Desorption und Teilchenausbreitung . . . . .	32
3.4.4.4 Ionenentstehung . . . . .	35
3.4.5 Massenanalysatoren in der Massenspektrometrie . . . . .	40

3.4.5.1	Funktionsweise eines Ionenfallenmassenanalysators . . . . .	41
3.4.5.2	Funktionsweise eines Fourier-Transform Ionen-Cyclotron-Resonanz (FT-ICR) Massenanalysators . . . . .	46
3.5	Untersuchung von Biomolekülen mit hoher Massenauflösung und hoher Massengenauigkeit . . . . .	51
3.6	Bildgebenden Massenspektrometrie . . . . .	52
3.7	Zellkultur . . . . .	55
3.7.1	Bestandteile von klassischen Zellkulturmedien . . . . .	58
3.7.2	Serumfreie Zellkulturmedien . . . . .	59
3.8	Kompatible Lösungsmittel ( <i>compatible solutes</i> ) . . . . .	59
3.9	Ziel dieser Arbeit . . . . .	61
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>62</b>
4.1	Das Massenspektrometer <i>Finnigan</i> LTQ-FT und die zugehörige Bediensoftware (LTQTune™, Xcalibur™) . . . . .	62
4.1.1	Kalibrierung und Geräteparameter . . . . .	64
4.1.2	Automatic Gain Control (AGC) – Stetigkeit des Ionensignals ohne AGC . . . . .	65
4.2	AP-SMALDI Ionenquelle . . . . .	67
4.2.1	Stickstofflaser . . . . .	69
4.2.2	Dielektrischer, variabler Abschwächer . . . . .	69
4.2.3	Statische Abschwächer . . . . .	70
4.2.4	Elektrostatische Ionenblende . . . . .	70
4.2.5	x,y,z-Probenverfahrensystem . . . . .	70
4.3	Laserenergiemessung und Laserstrahl-Charakterisierung ( <i>beam profiling</i> ) . . . . .	71
4.4	Probenträger . . . . .	72
4.5	Datenakquisition und Bilderstellung ( <i>imaging</i> ) . . . . .	74
4.6	Ergänzende Software . . . . .	75
4.7	Mikroskope . . . . .	76
4.8	Artifizielle Proben . . . . .	76
4.8.1	Farbstofffilm (LDI) . . . . .	77
4.8.2	Strukturierte artifizielle Oberflächen . . . . .	77
4.8.2.1	LDI Proben . . . . .	77
4.8.2.2	SMALDI Proben . . . . .	78
4.8.3	„Bioprinted Molecules“ – Gedruckte Biomolekülmuster . . . . .	78
4.9	Probengewinnung (biologische Proben) . . . . .	79



4.9.1	Zellproben . . . . .	80
4.9.2	Gewebeproben . . . . .	81
4.10	Probenpräparation . . . . .	83
4.10.1	Pneumatic Assisted Spray (Airspray) Verfahren . . . . .	83
4.10.2	Nutzung von Zellpuffer und <i>Airspray</i> . . . . .	83
4.10.3	Verwendung von Trypsin . . . . .	84
4.11	Massenspektrometereinstellungen, Ionenquelleneinstellungen, Präparation (Scanning LDI (SLDI), MALDI, SMALDI) . . . . .	85
4.11.1	LDI/SLDI . . . . .	85
4.11.2	MALDI . . . . .	85
4.11.3	SMALDI – strukturierte artifizielle Oberflächen . . . . .	87
4.11.4	SMALDI – <i>bioprinted molecules</i> . . . . .	89
4.11.5	SMALDI – biologische Proben . . . . .	93
4.11.5.1	Zellproben (Waschprotokolle) . . . . .	93
4.11.5.2	Zellproben (Einzelprobenvorbereitung) . . . . .	94
4.11.5.3	Gewebeproben (Waschprotokolle) . . . . .	95
4.11.5.4	Gewebeproben (Einzelprobenvorbereitung) . . . . .	96
<b>5</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>98</b>
5.1	Apparative Ergebnisse (Hardware und Software) . . . . .	98
5.1.1	Modul 1 . . . . .	99
5.1.1.1	Optische und mechanische Bauteile . . . . .	99
5.1.2	Modul 2 . . . . .	99
5.1.2.1	Quarzfenster, Spiegel und Objektiv . . . . .	100
5.1.2.2	Ionenoptischer Aufbau . . . . .	101
5.1.2.2.1	Die verlängerte Ionentransferkapillare . . . . .	102
5.1.2.3	Die Beobachtungsoptik . . . . .	102
5.1.3	Modul 3 . . . . .	104
5.1.4	Justierung der AP-SMALDI Ionenquelle . . . . .	107
5.1.5	Zusammenhang der Blenden- und Probenzellspannung . . . . .	108
5.1.6	nESI Kalibrierhilfe für die AP-SMALDI Ionenquelle am <i>Finnigan</i> LTQ-FT . . . . .	111
5.1.7	Integrierter Steuerkreis für die rasternde massenspektro- metrische Untersuchung . . . . .	112
5.1.7.1	USB Controller – Mikrokontrolleraufbau zur ex- ternen Triggerung . . . . .	114
5.1.7.2	Integrierendes Steuerprogramm – Master Con- trol Program (MCP) . . . . .	114

5.1.7.3	Externe Triggerung: Patches zur soft-/hardware- seitigen Be- fähigung des Massenspektrometers .	118
5.1.8	Zweistufige Voro- optik der AP-SMALDI Ionenquelle (Tele- skopoptik) . . . . .	118
5.1.8.0.1	Ionenoptischer Aufbau . . . . .	119
5.1.8.0.2	Ionentransferkapillare . . . . .	120
5.1.9	Ergebniszusammenfassung – Apparative Ergebnisse . . . .	120
5.2	Diskussion der Apparativen Ergebnisse (Hardware und Software)	121
5.3	Experimentelle Ergebnisse – Optischer Laserfokusdurchmesser, Desorptions-Laserfokusdurch- messer: LDI und SLDI . . . . .	128
5.3.1	Optischer Laserfokusdurchmesser . . . . .	128
5.3.1.1	Einstufige Voro- optik . . . . .	128
5.3.1.2	Zweistufiger Voro- optik (Teleskopoptik) . . . . .	128
5.3.2	LDI . . . . .	129
5.3.2.1	Einstufige Voro- optik . . . . .	129
5.3.2.1.1	Effektive Laterale Auflösung: . . . . .	129
5.3.2.1.2	Desorptions-Laserfokusdurchmesser . .	130
5.3.2.1.3	Ausreichender Desorptions-Laserfokus- durchmesser (LTQ MS) . . . . .	131
5.3.2.1.4	Ausreichender Desorptions-Laserfokus- durchmesser (FT MS) . . . . .	132
5.3.2.2	Brennfleckenvergleich: einstufige und zweistufi- ge Voro- optik . . . . .	133
5.3.3	Scanning Laser Desorption/Ionisation – SLDI . . . . .	135
5.3.4	Ergebniszusammenfassung – Optischer Laserfokusdurch- messer, LDI und SLDI . . . . .	136
5.4	Diskussion der Experimentellen Ergebnisse – Optischer Laserfo- kusdurchmesser, LDI und SLDI . . . . .	136
5.5	Experimentelle Ergebnisse – Probengewinnung . . . . .	142
5.5.1	Adaptierung der Zelllinien an serumfreie Medien (Zellkul- tur) . . . . .	142
5.6	Diskussion der Ergebnisse – Probengewinnung . . . . .	144
5.7	Experimentelle Ergebnisse – Zellpuffer, artifizielle Proben, Zell- und Gewebepvorbereitung, SMALDI-Präparation und -Untersuchung . . . . .	145
5.7.1	Zellpuffer – Entwicklung eines neuen Matrixgemisches . .	145

5.7.1.1	Zusammensetzung der Zellpuffer . . . . .	148
5.7.1.2	Applikation der Zellpuffer . . . . .	148
5.7.1.3	Massenspektrum des Zellpuffers . . . . .	150
5.7.1.4	Signalqualität der MS Spektren peptidischer Zellpuffer Präparationen . . . . .	151
5.7.1.5	Vergleich der Signalqualität und -intensität zwischen Zellpuffer und Standard MALDI Präparation . . . . .	152
5.7.2	Ergebniszusammenfassung – Zellpuffer . . . . .	155
5.7.3	Massenspektrometrische Untersuchung strukturierter artifizieller Oberflächen . . . . .	155
5.7.3.1	LTQ MS Untersuchungen . . . . .	155
5.7.3.2	FT MS Untersuchungen . . . . .	159
5.7.4	<i>Bioprinted molecules</i> – massenspektrometrische Untersuchung gedruckter, biomolekularer Proben . . . . .	161
5.7.4.1	Membranlipide . . . . .	161
5.7.4.1.1	LTQ MS Untersuchungen . . . . .	161
5.7.4.1.2	FT MS Untersuchungen . . . . .	164
5.7.4.2	Peptide . . . . .	164
5.7.4.2.1	LTQ MS Untersuchungen . . . . .	164
5.7.4.2.2	FT MS Untersuchungen . . . . .	166
5.7.4.2.3	Gemessene Analytmenge der gedruckten peptidischen Biomolekülmuster . . . . .	170
5.7.5	Ergebniszusammenfassung – artifizielle Proben und gedruckte Biomolekülmuster . . . . .	170
5.7.6	Probenvorbereitung . . . . .	172
5.7.6.1	Zellproben . . . . .	172
5.7.6.2	Gewebeproben . . . . .	174
5.7.7	Massenspektrometrische Untersuchung biologischer Proben	174
5.7.7.1	Zellproben . . . . .	174
5.7.7.1.1	LTQ MS Untersuchungen . . . . .	174
5.7.7.2	Gewebeproben . . . . .	178
5.7.7.2.1	LTQ MS Untersuchungen . . . . .	178
5.7.8	Ergebniszusammenfassung – biologische Proben . . . . .	185
5.8	Diskussion der Ergebnisse – Zellpuffer, artifizielle Proben, Zell- und Gewebevorbereitung, SMALDI-Präparation und -Untersuchung . . . . .	188

<b>6 Anhang</b>	<b>208</b>
6.1 Zellkultur . . . . .	208
6.2 Chemikalienliste . . . . .	210
6.3 Herstellerliste . . . . .	211
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>234</b>

# Tabellenverzeichnis

3.1	Massenanalysatoren . . . . .	22
4.1	Hardware-Software-Konfiguration (LTQ-FT, LTQTune/ <i>device file</i> , Xcalibur) . . . . .	64
4.2	Standard ESI Kalibrierlösung . . . . .	66
4.3	Statische Abschwächer (Laserenergieminderung) . . . . .	72
4.4	Biomolekülgemische (Peptide, Lipide) für das „Bioprinting“ . . . . .	79
4.5	Zelllinien und Zellkulturbedingungen . . . . .	82
5.1	Optische und mechanische Bauteile des Modul 1 . . . . .	101
5.2	Laseroptische Bauteile des Modul 2 . . . . .	102
5.3	Bauteile der Beobachtungsoptik am Modul 2 . . . . .	105
5.4	Formulierungen der Zellpuffer (ZP) 1, 2 und 2a . . . . .	149
5.5	Mögliche Ionenzusammensetzung (Zellpuffer 1 Massenspektren) . . . . .	151
5.6	Vergleich Signalintensität, Matrix/Analyt-Verhältnis und Desorptionsfläche: Standard MALDI und Zellpuffer 2 Präparation . . . . .	153
5.7	Vergleich Signalintensität und Desorptionsfläche . . . . .	184
6.1	<b>Zusammensetzung fötaler Kälberseren</b> . . . . .	208
6.2	<b>Chemikalienliste</b> . . . . .	210
6.3	<b>Herstellerliste</b> . . . . .	211

# Abbildungsverzeichnis

3.1	Geometrische Optik einer Lupe . . . . .	15
3.2	Geometrische Optik eines Kepler'schen Fernrohrs . . . . .	16
3.3	Rayleigh-Länge (axiale Dimension des optischen Fokus) . . . . .	17
3.4	Energiedichtevertelung im Laserstrahl und Abschwächung der Laserenergie . . . . .	19
3.5	Massenauflösung . . . . .	21
3.6	Lineare Quadrupolionenfalle . . . . .	42
3.7	Ionen-Stabilitätsbereiche im linearen Quadrupol . . . . .	45
3.8	ICR Messprinzip, Kubische ICR-Zelle . . . . .	48
3.9	Reale Ionenbewegungen in der ICR-Zelle . . . . .	50
3.10	MALDI <i>imaging</i> . . . . .	53
3.11	Zellzyklus einer eukaryotischen Zelle . . . . .	57
4.1	<i>Finnigan</i> LTQ-FT MS . . . . .	63
4.2	Totalionenstrom (TIC) des LTQ und ICR MS (Einzelschussbetrieb) . . . . .	67
4.3	AP-SMALDI Ionenquelle am <i>Finnigan</i> LTQ-FT MS (Foto, Schemazeichnung) . . . . .	68
4.4	<i>Beam-profile</i> Originallaserstrahl (MNL 202-LD) . . . . .	70
4.5	Laserenergiekennkurve im Probenbereich (AP-SMALDI Aufbau) . . . . .	71
4.6	Basisprobenträger (Schemazeichnung, Foto) . . . . .	73
4.7	<i>Imaging</i> Betriebsmodi . . . . .	75
4.8	<i>Airspray</i> Apparatur (Foto, Schemazeichnung) . . . . .	84
5.1	Modul 1 . . . . .	100
5.2	Modul 2 . . . . .	103
5.3	Verlängerte Ionentransferkapillare (Foto, Schemazeichnung) . . . . .	104
5.4	Modul 2 – Beobachtungsoptik (Foto, Schemazeichnung) . . . . .	104
5.5	Modul 3 (Schemazeichnung, Foto) . . . . .	106
5.6	Charakterisierung der Blenden und Probentellerspannung (einstufiger Aufbau) . . . . .	110

5.7	Hilfskonstruktion zur nESI Kalibrierung des <i>Finnigan</i> LTQ-FT MS (Foto, Schemazeichnung) . . . . .	111
5.8	Steuerkreis des AP-SMALDI Aufbaus . . . . .	113
5.9	USB-Controller . . . . .	115
5.10	Master Control Program – MCP . . . . .	117
5.11	Modul 2 als Teleskopaufbau . . . . .	119
5.12	Optischer Laserfokusbildungsmessgerät (AP-SMALDI Ionenquelle, einstufige Voroptik) . . . . .	129
5.13	Optischer Laserfokusbildungsmessgerät (AP-SMALDI Ionenquelle, zweistufige Voroptik) . . . . .	130
5.14	Kleinstmöglicher Desorptions-Laserfokusbildungsmessgerät der AP-SMALDI Ionenquelle . . . . .	131
5.15	Kleinstmöglich messbarer Desorptions-Laserfokusbildungsmessgerät der AP-SMALDI Ionenquelle (LTQ MS) . . . . .	132
5.16	Ausreichender Desorptions-Laserfokusbildungsmessgerät (LTQ MS) . . . . .	132
5.17	Ausreichender Desorptions-Laserfokusbildungsmessgerät (FT MS) . . . . .	133
5.18	Brennfleckenvergleich (einstufige, zweistufige Voroptik) . . . . .	134
5.19	Rasternde Untersuchung (SLDI, FT MS) – Farbstofffilm mit Gitter . . . . .	135
5.20	Energieverteilung im Laserfokus . . . . .	141
5.21	Zelllinie 8305C in konventioneller und serumfreier Kultur . . . . .	143
5.22	Zelllinie HeLa in konventioneller und serumfreier Kultur . . . . .	143
5.23	Viskosität des Zellpuffers . . . . .	146
5.24	Kristallisierter Zellpuffer 1 über HeLa Zellen . . . . .	147
5.25	Erstarrter Zellpuffer 1 über HeLa Zellen . . . . .	147
5.26	Massenspektren von reinem Zellpuffer 1 . . . . .	150
5.27	Massenspektrum einer Peptidmischung in Zellpuffer 2 . . . . .	152
5.28	Massenspektren einer peptidischen Standard MALDI Präparation und in Zellpuffer 2 . . . . .	154
5.29	Strukturierte Zellpuffer-Peptidpräparation ( <i>dried droplet</i> ), SMALDI <i>image</i> (Einzelschussspektren, MS <sup>1</sup> , LTQ MS) . . . . .	156
5.30	Peptidpräparation mit Zellpuffer 2 auf geätztem Silizium Wafer . . . . .	157
5.31	Peptidpräparation (geätzter Silizium Wafer), SMALDI <i>image</i> (Einzelschussspektren, MS <sup>1</sup> , LTQ MS) . . . . .	158
5.32	Peptidpräparation (geätzter Silizium Wafer), SMALDI <i>images</i> (Einzelschussspektren summiert, MS <sup>2</sup> , LTQ MS) . . . . .	159
5.33	Strukturierte Peptidpräparation, SMALDI <i>image</i> (Einzelschussspektren, MS <sup>1</sup> , FT MS) . . . . .	160

5.34 Gedruckte Lipidmuster, SMALDI <i>images</i> (Einzelschussspektren summiert, MS <sup>1</sup> , LTQ MS) . . . . .	162
5.35 Gedrucktes Lipidmuster, MALDI (Einzelschussspektren, MS <sup>2</sup> , LTQ MS) . . . . .	163
5.36 Gedrucktes Lipidmuster, MALDI Spektrum (Einzelschussspektren, MS <sup>1</sup> , FT MS) . . . . .	164
5.37 Gedrucktes Peptidmuster, SMALDI <i>image</i> , (Einzelschussspektren, MS <sup>1</sup> , LTQ MS) . . . . .	166
5.38 Gedrucktes Peptidmuster, MALDI Spektrum (Einzelschussspektren, MS <sup>2</sup> , <i>data dependent</i> -Modus, LTQ MS) . . . . .	167
5.39 Gedrucktes Peptidmuster, SMALDI <i>image</i> , (Multischussspektren, MS <sup>1</sup> , FT MS) . . . . .	168
5.40 Gedrucktes Peptidmuster, SMALDI <i>images</i> , (Multischussspektren, MS <sup>1</sup> , FT-SIM MS) . . . . .	169
5.41 Gedrucktes Peptidmuster, SMALDI <i>image</i> (Multischussspektren, MS <sup>2</sup> , FT MS) . . . . .	171
5.42 Vergleich wässriger und lipophiler Zellvorbereitung . . . . .	173
5.43 Mikroskopischer Vergleich unterschiedlicher Vorbereitungen von Rattengewebe . . . . .	175
5.44 HeLa Zellen, SMALDI <i>image</i> (Multischussspektren, MS <sup>1</sup> , LTQ MS) . . . . .	176
5.45 HeLa Zellen, SMALDI <i>image</i> (Multischussspektren, MS <sup>1</sup> , LTQ MS) . . . . .	177
5.46 <i>Trichinella spiralis</i> kontaminiertes Rattengewebe, SMALDI <i>image</i> (Multischussspektren, MS <sup>1</sup> , LTQ MS) . . . . .	179
5.47 Interner Peptidstandard bei Rattengewebe, Vergleich der SMALDI <i>images</i> bei unterschiedlicher Vorbereitung und Präparation (Multischussspektren, MS <sup>1</sup> , LTQ MS) . . . . .	182



# Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ -CHCA .....	(Z)-2-cyano-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-ensäure
2,5-DHB .....	2,5-Dihydroxybenzoesäure
amu .....	Atomic Mass Unit (eine atomare Masseneinheit= $1,6605 \cdot 10^{-27}$ kg)
AP .....	Atmospheric pressure (Atmosphärendruck)
APPI .....	Atmospheric Pressure Plasma Ionization (Ionisationsverfahren)
CI .....	Chemical Ionisation (Ionisationsverfahren)
CID .....	Collision Induced Dissociation (Verfahren zur Erzeugung von Fragmenten aus Vorläuferionen durch Stoßenergetisierung)
Da .....	Dalton (in der Biochemie gebrauchter Begriff, entspricht 1amu); siehe 'amu'
DMEM .....	Dulbeccos Minimum Essential Medium
DPBS .....	Dulbeccos Phosphate Buffered Saline (Dulbeccos Natrium-Phosphat Puffer)
EI .....	Electron Ionisation (Ionisationsverfahren)
ESI .....	Electron Spray Ionisation (Ionisationsverfahren)
FAB .....	Fast Atom Bombardment (Ionisationsverfahren)
FBS .....	Fetal Bovine Serum (Fötales Rinderserum),= FCS
FCS .....	Fetal Calf Serum (Fötales Kälberserum),= FBS
FD .....	Field Desorption (Ionisationsverfahren)
FI .....	Field Ionization (Ionisationsverfahren)
FT-ICR .....	Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance (Massenanalysatortyp)
FWHM .....	Full Width at Half Maximum (Volle Weite bei halber Peakhöhe)
HF .....	Hellfeld (lichtmikroskopisches Standardverfahren)
IR .....	Infrarot
LDI .....	Laser Desorption Ionization (Ionisationsverfahren)
LTQ .....	Linear Quadrupol Iontrap (Lineare Quadrupol Ionenfalle), (Massenanalysatortyp)

MALDI .....	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization (Ionisationsverfahren)
MEM .....	Minimum Essential Medium
MS .....	Mass Spectrometry (Massenspektrometrie), Mass Spectrometer (Massenspektrometer)
MS <sup>1</sup> .....	Massenspektrometrische Untersuchung von Vorläuferionen
MS <sup>2</sup> .....	Massenspektrometrische Untersuchung von Fragmentionen der Vorläuferionen
MW .....	Molecular Weight (Molekulargewicht [Da])
NEAA .....	Non Essential Amino Acids
PEG .....	Polyethylenglykol
PhaKo .....	Phasenkontrast (spezielles lichtmikroskopisches Verfahren zur Erhöhung des Kontrastes bei der Beobachtung)
PTM .....	Post Translational Modification, Posttranslationale Modifikation
RPMI .....	Name des Entwicklungsortes: Roswell Park Memorial Institute
SIM .....	Single Ion Monitoring (empfindlicherer Untersuchungsmodus des FT-ICR Massenanalysators am LTQ-FT)
SIMS .....	Secondary Ion Mass Spectrometry (Sekundär Ionen Massenspektrometrie)
SLC .....	Single Letter Code (Einzelbuchstabenkodierung der Aminosäuren)
SMALDI .....	Scanning Microprobe Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization (rasterndes Ionisationsverfahren)
TFA .....	Trifluor Acetic Acid (Trifluoressigsäure)
TOF .....	Time of Flight (Massenanalysatortyp)
Trypsin-EDTA ...	Endoprotease Trypsin in Lösung stabilisiert durch EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)
u .....	Unit (Kurzform von 'Atomic Mass Unit'); siehe 'amu'
UV .....	Ultravioletter Bereich des elektromagnetischen Spektrums ( $\lambda=1-380\text{nm}$ )
VIS .....	Sichtbarer (visueller) Bereich des elektromagnetischen Spektrums ( $\lambda=380-780\text{ nm}$ )

## **Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich diese Doktorarbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe. Diese Doktorarbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen.

Gießen, im September 2010

# Kapitel 1

## Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl apparative, als auch präparative und analytische Fragestellungen bearbeitet. Dabei wurde zunächst eine neue, rasternde, lateral hochauflösende MALDI Ionenquelle entwickelt. Die Ionenquelle ist im aktuellen Zustand direkt an das *Finnigan* LTQ-FT Massenspektrometer ankoppelbar. Prinzipiell kann der modulare Aufbau so modifiziert werden, dass dieser an jedem Massenspektrometer verwendet werden kann, dessen Ionenquellen unter Atmosphärendruck- oder Vorvakuumbedingungen arbeiten. Der entstandene Aufbau erlaubt flexible Untersuchungsmöglichkeiten unterschiedlicher Proben bei einem Laserfokusbereich  $<10\,\mu\text{m}$ . Neben unterschiedlichen artifiziellen Proben wurden biologische Proben untersucht. Dazu wurden präparative Techniken entwickelt und angewendet, die zu einer gesteigerten Authentizität der Präparation biologischer Proben für die bildgebende Massenspektrometrie beitragen. Nicht nur die Vorbereitung der biologischen Proben wurde dabei berücksichtigt, auch die Entwicklung eines neuartigen Matrixgemisches mit sehr vorteilhaften Eigenschaften konnte erzielt und demonstriert werden.

Allgemein erlaubt die Anordnung von Komponenten innerhalb eines Systems Rückschlüsse auf die Funktion und Bedeutung der jeweiligen Komponenten im System (*form follows function*). Dies trifft sowohl für artifizielle als auch für biologische Systeme zu. Bei biologischen Systemen findet man dieses Prinzip bis hinunter zur molekularen Ebene innerhalb von Zellen und Geweben. Krankheiten können diese zeitlich-räumliche Koordination der endogenen Komponenten stören und so deren Funktion beeinträchtigen. Die Auswirkungen dieser Beeinträchtigungen können auf organismischer Ebene so weit gehen, dass sie bis zu dessen Tod führen. Das grundlegende Verständnis solcher Vorgänge und Funktionen ist deshalb von vielfältigem naturwissenschaftlichem Interesse.

Unterschiedliche Methoden wurden deshalb in der Vergangenheit entwickelt, um räumlich aufgelöste Untersuchungen biologischer Systeme durchführen zu können. Ziel ist die Visualisierung von Verteilungsmustern relevanter *target*-Strukturen (engl.: *imaging*). Während anfänglich molekularbiologische Methoden, wie z.B. histologische und immunhistologische Färbeverfahren, den Schwerpunkt in dieser Hinsicht bildeten, treten seit etwa drei Jahrzehnten apparative Untersuchungsmethoden immer stärker hinzu. Dabei gewinnt die Massenspektrometrie einen immer höheren Stellenwert. Bedingt durch die polaren und thermisch-labilen Eigenschaften hochmolekularer Biomoleküle ist die Massenspektrometrie im Bereich der Lebenswissenschaften vor allem mit zwei Ionisationsverfahren vertreten: durch die *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation* (MALDI) und die *Electrospray Ionisation* (ESI). Heutzutage können diese Ionisationsverfahren vielfältig mit verschiedenen Massenanalysortypen kombiniert werden. Von diesen beiden Ionisationsverfahren ist jedoch lediglich MALDI in der Lage biologische Proben, bei weitestgehender Beibehaltung des räumlichen Kontextes, einer Untersuchung zugänglich zu machen. Die Kombination von MALDI mit einem *Time-of-Flight* (ToF) Massenanalysator ist dabei die dominierende Kombination zur ortsaufgelösten Probenuntersuchung. ToF-Massenanalysatoren zeichnen sich vor allem durch ihre Analysegeschwindigkeit und ihre Empfindlichkeit aus. Gerade zur Untersuchung komplexer, biologischer Proben und zur Identifikation ihrer Inhaltsstoffe sind noch weitere Eigenschaften von Massenanalysatoren wichtig. Hierzu zählen eine hohe Massengenauigkeit und Massenauflösung, die Möglichkeit Ionen sammeln und geschlossen analysieren zu können sowie die Fähigkeit zur Fragmentionenanalyse ( $MS^n$ ). Hier sind Fourier Transform-Ionen Cyclotron Resonanz (FT-ICR) und Ionenfallenmassenanalysatoren deutlich leistungsfähiger und komfortabler als ToF-Analysatoren. Hinzu kommt, dass MALDI-Ionenquellen für ToF Massenanalysatoren häufig unter Hochvakuum betrieben werden, was die Untersuchung flüchtiger Proben nahezu unmöglich macht.

Zur Steigerung der Leistungsfähigkeit bei der ortsaufgelösten MALDI Massenspektrometrie wurde, im Rahmen dieser Arbeit, eine lateral hochauflösende, rasternde AP-SMALDI (engl.: *atmospheric pressure scanning microprobe* MALDI) Ionenquelle entwickelt. Die neue Ionenquelle ist modular aufgebaut und wurde so entwickelt, dass sie an linearen Ionenfallen und FT-ICR Massenspektrometern verwendet werden kann. Somit ist die Kombination vielfältiger massenanalytischer Möglichkeiten mit der hoch-ortsaufgelösten Probenuntersuchung durch AP-SMALDI gelungen. Derzeit wird die Ionenquelle am *Finnigan* LTQ-FT MS verwendet und kann an die vom Hersteller, für die kommerziellen

Ionenquellen vorgesehenen Befestigungen, angebracht werden.

Die neue Ionenquelle besteht aus drei Modulen und weist als zentralen Bestandteil eine koaxiale Laser- und Ionenoptik auf. Modul 1 befindet sich auf dem LTQ MS und beinhaltet, neben dem N<sub>2</sub>-Laser, eine Vorfokussierlinse und diverse optische Bauteile zur Laserstrahlenkung und Regulation der Laserenergie. Modul 2 befindet sich an der Front des LTQ MS und trägt, als zentrales Bauelement dieser Ionenquelle, ein durchbohrtes, mehrlinsiges Laserobjektiv sowie eine elektrostatische Ionenblende. Weiterhin gehört zum Modul 2 eine verlängerte Ionentransferkapillare, die die erzeugten Ionen in das MS transferiert. Modul 3 schließt sich an Modul 2 an und trägt ein präzises Probenpositioniersystem (engl.: *x,y,z-stage*). Zusätzlich entwickelte Soft- und Hardware ermöglicht einen Steuerkreis zur externen Triggerung des LTQ-FT MS, so dass Proben in unterschiedlichen Modi (manuell oder rasternd, Einzelschussspektren oder Multischussspektren) untersucht werden können. Die Einstellung der lateralen Auflösung erfolgt dabei zum einen über Schrittkremente des Probenpositionierungssystems, zum anderen über die Abschwächung der Laserenergie des gaußähnlichen N<sub>2</sub>-Laserstrahlprofils u.U. gekoppelt mit einer Repositionierung der Probe in z-Richtung. Der optische Laserfokusedurchmesser wurde mittels *beam profiler* vermessen (1/e<sup>2</sup>-Kriterium). Untersuchungen der Empfindlichkeit des Gesamtaufbaus am LTQ-FT MS wurden auf der Basis von Brennflecken (Näherungswert des Desorptions-Laserfokusedurchmessers) in einer homogenen Farbstoffschicht (roter Edding®-Farbstift, Farbstoff: Rhodamin-6G) in Relation zur Signalstärke (*normalized level*, NL) am MS ohne Applikation von Matrix (LDI-Modus) durchgeführt. Es wurden zwei Varianten der Vorohtik untersucht (einstufig, zweistufig). Der einstufige, praxisrelevantere Aufbau wurde hierbei ausgiebiger charakterisiert. Die Messungen des einstufigen Aufbaus ergaben einen optischen Laserfokusedurchmesser von  $\bar{x}=6,6\,\mu\text{m} \pm 0,7\,\mu\text{m}$  in x-Richtung,  $\bar{y}=5,8\,\mu\text{m} \pm 0,8\,\mu\text{m}$  in y-Richtung und  $6,2\,\mu\text{m} \pm 0,6\,\mu\text{m} \varnothing$  (elliptisches Profil wird vereinfachend als umgerechneter Kreisdurchmesser ausgedrückt). Dem gegenüber steht der Desorptions-Laserfokusedurchmesser (Brennfleck). Der kleinste, lichtmikroskopisch erkennbare Desorptions-Laserfokusedurchmesser beträgt  $\approx 0,5 \times 0,6\,\mu\text{m}$ . Erste Ionensignale am LTQ MS konnten bei einem Desorptions-Laserfokusedurchmesser von  $\approx 0,9 \times 1\,\mu\text{m}$  gemessen werden. Ein stetiges Ionensignal mit  $\approx 2 \times 10^1$  NL konnte am LTQ MS bei einem Desorptions-Laserfokusedurchmesser von  $\approx 1,2 \times 3\,\mu\text{m}$  ( $\approx 2,8\,\mu\text{m}^2$ ) gemessen werden. Ein stetiges Signal erreicht man am FT MS, bei den gewählten Ionenquellenbedingungen, erst bei einem Desorptions-Laserfokusedurchmesser von  $\approx 2,2 \times 5\,\mu\text{m}$  ( $\approx 6,9\,\mu\text{m}^2$ ). An einem farbstoffbeschichteten, strukturierten Standard-Probenträger wurden erste

rasternde Untersuchungen mittels FT MS durchgeführt. Die laterale Auflösung betrug dabei  $\approx 7,6 \mu\text{m}$ .

Die Untersuchung artifizierlicher, biomolekularer Proben ging mit der Entwicklung eines neuen, rein wässrigen Präparationsansatzes einher. Diese Matrixmischung wird als Zellpuffer bezeichnet. Der Zusatz von Tris-HCl und D(-)Mannitol zu einer rein wässrigen 2,5-DHB Matrixlösung führte zur Änderung des Kristallisationsverhaltens der Matrix. Die Matrix kristallisiert, statt wie in MALDI-Standard-Präparationen heterogen und oft in Form großer Makrokristalle, nun homogen und mikrokristallin aus. Dies ermöglichte die problemlose, authentische Präparation geätzter Mikrostrukturen aus Silizium Wafern. Als artifizierliche, biomolekulare Proben wurden neben Wafern noch durch metallische Gitter strukturierte Proben und gedruckte Biomolekülmuster untersucht. Die Konzentration der verwendeten Peptide bewegte sich dabei im Bereich von  $1 \cdot 10^{-5}$  bis  $1 \cdot 10^{-6}$  mol/L. Die rasternden Untersuchungen wurden alle mit einer lateralen Auflösung  $< 9 \mu\text{m}$  durchgeführt. Berechnungen der für die Erstellung von *images* verbrauchten Analytmenge ergaben  $\approx 50 \cdot 10^{-18}$  mol/Pixel bei Zellpuffer Präparationen und  $\approx 90 \cdot 10^{-18}$  mol/Pixel bei 2,5-DHB-MALDI Standardpräparationen. Untersuchte Lipidproben waren mit  $\approx 2 \cdot 10^{-3}$  mol/L deutlich höher konzentriert. An den unterschiedlich gestalteten und konzentrierten Proben konnten LTQ MS, LTQ MS<sup>2</sup>, FT MS und FT MS<sup>2</sup> Messungen durchgeführt werden. Die FT MS und FT MS<sup>2</sup> Messungen konnten jedoch lediglich mit eingeschränktem Massenbereich oder im SIM Modus durchgeführt werden.

Die Entwicklung und Verwendung der Zellpuffer erfolgte im Hinblick auf eine möglichst authentische Präparation biologischer Proben. Als rein wässriges System bewirkt es, im Gegensatz zu stark lipophilen organischen Lösungsmitteln, minimale Desintegration zellulärer Strukturen. Neben der mikrokristallinen Kristallisation von 2,5-DHB in der Mischung sind ein Anstieg der Viskosität bei einem intermediären Trocknungsstatus, die Eignung als Milieu für Trypsin und die Steigerung der Signalintensität im Vergleich zu Standard-Präparationen weitere interessante Eigenschaften. Vergleichsmessungen zwischen vorgemischten Zellpuffer-Peptid- und Standard-DHB-Peptidpräparationen zeigten für die Zellpufferpräparation eine Verdopplung der Signalintensität bei gesenktem Analytverbrauch. Zusätzlich wurde die Eignung unterschiedlicher Waschprotokolle zur Vorbereitung von Zellen und Geweben untersucht. Dabei erwiesen sich reine oder hoch konzentrierte Lösungen lipophiler organischer Lösungsmittel (Chloroform, Aceton, Aceton-Eisessig, Ethanol) als ungeeignet zur Vorbereitung von Zellproben. Schwach konzentrierte alkoholische oder rein wässrige Lösungen sind hier angeraten. Dahingegen können Gewebe bzw. Gewebedünnschnitte

durchaus mit lipophilen Lösungsmitteln vorbereitet werden. Hier erbrachte die Vorbereitung mit Aceton + 10 % Eisessig optimale Ergebnisse in bezug auf massenspektrometrische Signalqualität und Gewebeintegrität.

Als biologische Proben wurden sowohl Zellproben als auch Gewebeproben massenspektrometrisch untersucht. Als Zellproben dienten unterschiedliche permanente humane Krebszelllinien. Bei den Gewebeproben handelte es sich um mit *Trichinella spiralis* kontaminiertes Rattengewebe (Skelettmuskulatur) und Mäusegewebe (Hirn und Skelettmuskulatur). Als Bestandteil dieser Arbeit wurden die permanenten Zelllinien zunächst von Standard-Zellkulturmedien auf serumfreie Zellkulturmedien adaptiert. Ziel war die Reduktion von Hintergrundsignalen in den Massenspektren von möglicherweise an den Zellen anhaftenden Komponenten des Zellkulturmediums. Bei der Anfertigung der Dünnschnitte am Kryomikrotom wurde auf die Benutzung von PEG-haltigen Schnitthilfen verzichtet. Die biologischen Proben wurden unter Verwendung unterschiedlich proportionierter Zellpuffer, teilweise in Verbindung mit Matrix-Sprühpräparation (*Airspray*), präpariert. Die rasternden Untersuchungen biologischer Proben waren ausschließlich unter Verwendung des LTQ MS erfolgreich. Sowohl bei den Zell- als auch den Gewebeproben konnten Verteilungsbilder des wichtigen Membranlipidbestandteils Phosphatidylcholin 34:1 (PC 34:1) erzeugt werden. PC 34:1 trat überwiegend in Form des  $[M+DHB-H_2O+H]^+$ -Ions auf. Auch weitere Membranlipidkomponenten konnten in den Spektren beobachtet werden, wurden jedoch nicht näher in ihrer Verteilung charakterisiert. Trotz verschiedener Ansätze bei der Vorbereitung und Untersuchung der biologischen Proben, konnten keine Verteilungsbilder nativer Peptide erzeugt bzw. Peptide in den Spektren zweifelsfrei identifiziert werden. Deshalb wurden unterschiedlich hoch konzentrierte, interne Standardpeptide auf Mäusegewebeschnitte aufgebracht. Die nachfolgenden Untersuchungen zeigten, dass ausschließlich das in der höchsten Konzentration zugesetzte Peptid (Bradykinin 1-7;  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/L) zweifelsfrei gemessen werden konnte. Der berechnete Verbrauch an Analyt/Pixel liegt dabei im Schnitt etwa um die Hälfte höher, als bei reinen *dried droplet* Zellpuffer Präparationen. Die Komplexität der Probe beeinflusst demnach die Messsensitivität für die einzelnen Komponenten in erheblichem Maße. Die Abundanz endogener Proteinbestandteile im Muskelgewebe reicht also bislang nicht aus, um über Untersuchungen mit derart hoher räumlicher Auflösung am AP-SMALDI Aufbau gemessen werden zu können. Dies bedeutet die Notwendigkeit zur Steigerung der Sensitivität des AP-SMALDI Aufbaus und des Messverfahrens, um derart komplexe Proben erfolgreich messen und massenspektrometrische Verteilungsbilder erstellen zu können.



## Kapitel 2

### Summary

As well hardware as preparative and analytical questions have been addressed within the framework of this thesis. Therefor first a new scanning microprobe MALDI ion source with a high lateral resolution has been developed. Actually this ion source is easily mountable to the Finnigan LTQ FT mass spectrometer. In principal the modular setup can be modified to be used with every other mass spectrometer which works with atmospheric pressure or low pressure ion sources. The design of the setup allows one to flexibly investigate different kinds of samples with a laser focal diameter  $<10\,\mu\text{m}$ . Beside different artificial samples also biological samples have been investigated. Therefor new preparative techniques have been developed and used. They led to an increased authenticity in sample preparation of biological samples for imaging mass spectrometry. Not only the priming of the samples have been taken into account, also a new matrix mixture has been developed and its very interesting characteristics could be shown.

The arrangement of components within a system allows to draw conclusions about function and meaning of each of the components in the system (form follows function). This is the case for artificial as well as for biological systems. In biological systems this principle can be found even at the molecular level of cells and tissues. Diseases can perturb this temporal and spatial coordination and thus impair the component's function. The impact of such kind of perturbation can lead to death, in the organismic context. Due to this, the fundamental understanding of such processes and functions is of versatile scientific interest.

Therefore different techniques were developed in the past to investigate biological systems with spatial resolution. The aim is the visualisation of distribution patterns of relevant target structures (imaging). In the beginning molecular biological techniques had been dominating (e.g. staining and immuno

staining) for these investigations but since almost three decades now instrumental techniques become more and more important. Within these techniques mass spectrometry (MS) becomes more and more prominent. Due to the polar and thermolabile properties of macromolecular biomolecules mass spectrometry is first of all present with two ionization techniques within life sciences: the matrix assisted laser desorption/ionization (MALDI) and the electrospray ionisation (ESI) technique. These ionisation techniques can be combined with different types of mass analyzers. As one of these two ionisation techniques only MALDI mass spectrometry is capable of investigating biological samples while mostly maintaining their native structure. MALDI TOF mass spectrometry is thus still the dominating combination for investigations aiming a spatial resolution of a given sample. TOF mass analyzers are very sensitive and allow fast analysis. But especially for the investigation of complex biological samples and their substances of content, other capabilities of mass analyzers are important. They include a high mass accuracy and mass resolution, the possibility to collect ions and analyse them together as well as fragmentation capabilities ( $MS^n$ ). Concerning these aspects Fourier transform ion cyclotron resonance (FT ICR) and ion trap mass analyzers are much more powerful and more convenient to use than TOF mass analyzers. Additionally MALDI ion sources operate mostly under high vacuum conditions when they are used with a TOF mass analyzer. This prevents the investigation of volatile samples almost completely.

To enhance the capabilities for spatial mass spectrometry analysis a new AP SMALDI (atmospheric pressure scanning microprobe MALDI) ion source, providing a high lateral resolution, has been developed. At the moment the new ion source works at the Finnigan LTQ FT, has a modular setup and can be mounted just as the manufacturer's ion sources. The ion source consists of three modules and has a co-axial laser and ion optics as central element. Module 1 is positioned right above the LTQ MS and carries the  $N_2$ -laser, a pre-focusing lens and various laser optical components for laser guidance and laser energy adjustment. Module 2 is positioned in front of the LTQ MS and carries, as central element, the centrally bored, multilense laser objective as well as an electrostatic ion aperture. Additionally a prolonged ion transfer capillary is part of module 2, guiding generated ions into the MS. Module 3 is attached to module 2 and carries the accurate sample positioning system (x,y,z-stage). Additionally developed soft- and hardware provides a control circuit to drive the LTQ FT externally in different modi (manually and scanning, single shot spectra and multi shot spectra). The adjustment of the lateral resolution is achieved, on the one hand via definition of step increments of the sample positioning system, on

the other hand via laser energy adjustment of the nearly Gaussian N<sub>2</sub> laser profile sometimes accompanied by repositioning of the sample in z-direction. The optical laser focus diameter is measured using a beam profiling setup (1/e<sup>2</sup>-criterion). The determination of the sensitivity of the complete installed setup at the LTQ FT has been done by LDI measurements of a red dye coating (edding<sup>®</sup> felt tip pen, dye: Rhodamin-6G). The dimension of generated burn patterns in the dye coating by laser irradiation is related to the measured signal intensity (normalized level, NL). The burn patterns are an approximation of the desorption laser focus diameter. Two pre-focusing optical setups (single-stage, double-stage) were developed, but only the practically used single-stage setup has been further characterized. Measurements of the single-stage setup showed the following optical laser focus dimensions:  $\bar{x}=6,6\text{ }\mu\text{m} \pm 0,7\text{ }\mu\text{m}$  in x-direction,  $\bar{y}=5,8\text{ }\mu\text{m} \pm 0,8\text{ }\mu\text{m}$  in y-direction and  $6,2\text{ }\mu\text{m} \pm 0,6\text{ }\mu\text{m} \varnothing$  (for simplification the circular diameter has been calculated). At the opposite the desorption laser focus diameter has a minimum, light microscopically detectable dimension of  $\approx 0,5 \times 0,6\text{ }\mu\text{m}$ . First mass spectrometric ion signals at the LTQ MS could be observed by increasing the burn pattern to  $\approx 0,9 \times 1\text{ }\mu\text{m}$ . A continuous ion signal of  $\approx 2 \times 10^1$  NL at the LTQ MS could be observed by increasing the burn pattern size to  $\approx 1,2 \times 3\text{ }\mu\text{m}$  ( $\approx 2,8\text{ }\mu\text{m}^2$ ). The FT ICR MS showed a continuous ion signal not until increasing the burn pattern dimension to  $\approx 2,2 \times 5\text{ }\mu\text{m}$  ( $\approx 6,9\text{ }\mu\text{m}^2$ ). First scanning analysis on a dye coated, structured standard sample support had been performed using the FT MS. The lateral resolution was  $\approx 7,6\text{ }\mu\text{m}$ .

The investigation of artificial biomolecular samples has been accompanied by the development of a new aqueous preparation approach. The matrix mixture is named „Zellpuffer“. An aqueous solution of the matrix 2,5-DHB is supplemented with Tris-HCl and D(-)Mannitol achieving an alteration of the crystallisation behaviour of matrix. 2,5-DHB crystallises now homogenously and micro-crystalline, instead of building a heterogeneous pattern with partly large crystals as in standard MALDI preparations. This enables one to prepare easily and precisely e.g. etched silicon wafer with a fine structured surface. Besides etched silicon wafer also by metal grids structured surfaces and printed surfaces have been investigated as artificial biomolecular samples. The concentration of the used peptide solution ranges from  $1 \times 10^{-5}$  to  $1 \times 10^{-6}$  mol/L. The investigations were performed all with a lateral resolution  $< 9\text{ }\mu\text{m}$ . Calculations concerning the used amount of analyte per Pixel resulted in  $\approx 50 \times 10^{-18}$  mol/Pixel for Zellpuffer preparations and  $\approx 90 \times 10^{-18}$  mol/Pixel for standard 2,5-DHB MALDI preparations. Investigated lipid samples had been much higher concentrated ( $\approx 2 \times 10^{-3}$  mol/L). LTQ MS, LTQ MS<sup>2</sup>, FT MS und FT MS<sup>2</sup> measurements

could be carried out at the different shaped samples with different analyte concentrations. The FT MS and FT MS<sup>2</sup> measurements could be solely performed with a restricted mass range or while using the SIM mode.

The development of the Zellpuffer aimed the most authentic preparation of biological samples. As a pure aqueous system a minimum of desintegration of cellular structures was achieved. Beside the nice micro-crystalline behaviour of 2,5-DHB the mixture has interesting potential: an increase in viscosity at an intermediate dry state, maintained activity of Trypsin and an increase in signal intensity compared to standard MALDI preparations. Comparative measurements of premixed samples of peptide solutions using Zellpuffer and under standard MALDI conditions showed a doubling in signal intensity during less analyte usage for the Zellpuffer preparations. Additionally the suitability of different sample pre-treatments for cells and tissues had been investigated. Pure or highly concentrated solutions of lipophilic organic solvents (chloroform, acetone, acetone-glacial acetic acid, ethanol) are not suitable for the preparation of cells. Weakly organic or pure aqueous solutions should be used, whereas tissues or rather tissue thin sections can be treated with lipophilic organic solvents. Here treatment with acetone + 10 % glacial acetic acid showed optimum results concerning mass spectrometric signal quality and integrity of the tissue.

Cells and tissues were investigated as biological samples by mass spectrometry. Different permanent human cancer cell lines were used as cell samples. As tissue samples *Trichinella spiralis* contaminated rat tissue (skeleton muscle) and mouse tissue (brain, skeleton muscle) were investigated. During this work at first the adaptation of the used permanent cell lines from standard culturing conditions to serum-free media conditions was carried out. The aim was the reduction of eventually attached and mass spectrometrically interfering components deriving from standard cell culture media. The tissue thin sections were obtained from cooperating institutes. Cutting of the thin sections was carried out without TissueTek<sup>TM</sup>. The biological samples were prepared using differently composed Zellpuffer mixtures. The preparation was partly completed by standard pneumatic assisted matrix deposition (airspray). The investigation of biological samples could only be performed with the LTQ MS. Images of the important plasmalemmal component phosphatidylcholine 34:1 (PC 34:1) could be generated for cell as well as for tissue samples. PC 34:1 was predominant as  $[M+DHB-H_2O+H]^+$ -ion. Further plasmalemmal components could be observed in the mass spectra but their distribution patterns have not been characterized in detail. Despite the application of different sample pre-treatment and preparation procedures no native peptidic components of the biological samples

could be observed unequivocally in the mass spectra. Also no images could be generated. Due to this fact mouse tissue thin sections were spiked with internal standard peptides with different concentrations. The following investigations showed that only the peptide with the highest concentration (bradykinine 1-7;  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/L) could be observed. The calculated amount of analyte per pixel is 1.5 times higher as compared to pure dried droplet preparations with Zellpuffer. The sample's complexity seems to have a strong impact on measuring sensitivity for individual components. The abundance of endogenous proteinic components in skeleton muscle is too low to be measured with the chosen AP-SMALDI setup with such a high lateral resolution. Thus the sensitivity of the setup has to be increased to carry out successful measurements and generate images of such complex samples.

## Kapitel 3

# Einleitung

### 3.1 Die funktionelle Bedeutung biologischer Komponenten im Kontext ihrer lokalen Organisation

Schon relativ früh wurde der Satz „form follows function“ im Bereich der Wissenschaften geprägt. Seine Bedeutung erstreckt sich dabei über die klassischen Naturwissenschaften hinaus. Architektur und Design übernahmen diesen Leitsatz. Modernes Beispiel hierfür ist die Bionik. Theoretische Betrachtungen hierzu, in Bezug auf biologische Systeme, wurden spätestens seit Beginn des 20. Jahrhunderts durchgeführt. Hierbei wurde sowohl Phylogenese, als auch Ontogenese betrachtet (Smit, 1968). Die Betrachtungen bezogen sich also sowohl auf die Entwicklung von Arten, als auch die Entwicklung von Individuen und der dabei ablaufenden zeitlich-räumlichen Prozesse wie z.B. die Organogenese. Im Bereich der Medizin bzw. der Anatomie wurden Untersuchungen im Hinblick auf die Morphologie der Zelle, z.B. von Krebszellen (maligne, benigne), und den Zusammenhang mit ihrer Funktion durchgeführt und beschrieben (Shields, 1969). Insgesamt wurde also der Zusammenhang zwischen Form und Funktion zunächst auf die Form bezogen beschrieben, die der Forschung, mit Hilfe der Lichtmikroskopie, bis auf die Ebene der Zelle, als kleinster Einheit des Lebens, zugänglich war. Subzelluläre Strukturen konnten noch nicht untersucht werden. Mit zunehmender Entwicklung molekularbiologischer und apparativer Möglichkeiten wurden auch subzelluläre Ereignisse zugänglich und erforschbar. Das Repertoire umfasst unterschiedlichste Techniken:

1. Immunohistologische Färbeverfahren auf der Basis von Antikörpern gegen einzelne Zielstrukturen (Itoh et al., 2001),
2. spezifische DNA/RNA-Sonden zur Lokalisation von Motiven auf Ebene des Erbmaterials (Martin et al., 2005; Fricker et al., 2006) und

3. apparative Methoden wie Elektronenmikroskopie (TEM/REM) (Cilia und Jackson, 2004), Elektronen-Spin-Resonanz (ESR) (Leonard et al., 2002) und Massenspektrometrie (Feng et al., 2008; Wilm, 2009).

Aktuellere Arbeiten zeigen, dass es sowohl bei Tieren, als auch bei Pflanzen möglich ist, subzelluläre Strukturen zu untersuchen und funktionell zu charakterisieren. Eine wichtige Frage hierbei ist die Auswirkung der Umgebung auf die Funktion der jeweils beobachteten Struktur. Um also die Funktion einer Struktur oder eines Elementes z.B. innerhalb der Zellmembran zu verstehen, ist es wichtig ihren zellulären Kontext mit in Betracht zu ziehen. Aus diesem Grund ist eine Betrachtung nicht nur einer isolierten Komponente innerhalb eines Systems erforderlich, sondern eine Betrachtung der benachbarten Strukturen mit einbezieht (Sprong et al., 2001). Diese Form der Betrachtungsweise bezeichnet man als systemischen Ansatz oder Systembiologie. Darunter versteht man die Einbeziehung miteinander interagierender Komponenten in einem komplexen Ansatz, um auf komplexer Ebene Änderungen erfassen und interpretieren zu können. Lebende, biologische Systeme zeichnen sich durch eine sehr große Anzahl von Prozessen aus, die zeitlich-räumlich koordiniert und voneinander abhängig ablaufen und in die eine immens große Vielfalt an Biomolekülen involviert ist. Zu solchen Biomolekülen zählen Lipide, Proteine, Saccharide und Polynukleotide (DNA/RNA). Bereits diese Gruppen beinhalten eine sehr große Anzahl unterschiedlicher Moleküle bzw. Makromoleküle. Durch die zusätzliche Verknüpfung zwischen diesen Gruppen, z.B. in Form von Glykolipiden, Peptidoglykanen, Lipoproteinen, etc., potenziert sich die Anzahl möglicher Konstitutionen um ein Vielfaches. Unterschiede können zudem durch den Austausch von Isobaren verursacht sein. Bei Proteinen durch isobare Aminosäuren und bei Glykolipiden und Glykopeptiden der Austausch isobarer Zuckerreste. Gerade für die Untersuchung mit Hilfe der Massenspektrometrie bedeutet dies eine große Herausforderung. Da Isobaren in Verbindungen keinen Massenunterschied verursachen, können sie nicht ohne weiteres durch massenspektrometrische Untersuchungen nachgewiesen und somit Strukturen eindeutig aufgeklärt werden. Hinzu kommen weitere posttranslationale Modifikationen (PTM; zu denen auch die Glykosylierungen gezählt werden) wie z.B. Phosphorylierungen, Acylierungen, etc. (Amoresano et al., 2009; Morelle, 2009). Phosphorylierungen und Acylierungen stellen eine, in Bezug auf die Masse eines Proteins, recht kleine Massenveränderung dar. Die Veränderung ist jedoch, in nicht zu komplexen Massenspektren, eindeutig als PTM identifizierbar. Für die physiologische Aktivität und Wirksamkeit haben PTMs meist immense Bedeutung. Gerade Aktivierungen oder Deaktivierungen, z.B. von Proteinen, werden in biologischen

Systemen häufig über reversible Phosphorylierungen erzielt (Martínez et al., 1994; Vener et al., 1995; Liu et al., 2000).

## 3.2 Optik

Elektromagnetische Wellen können sich auf unterschiedliche Weise ausbreiten. Dabei bedürfen sie keines Mediums. Treffen elektromagnetische Wellen auf Materie können jedoch bestimmte optische Phänomene wie Brechung, Beugung, Reflektion, Absorption, Dispersion, usw. auftreten. Für die Massenspektrometrie i.e.S. MALDI MS ist nur ein bestimmter Teil des elektromagnetischen Spektrums interessant, dass sich etwa zwischen 200 und 3000 nm bewegt. Diese o.g. Phänomene sind bekannt aus der klassischen oder geometrischen Optik. Es handelt sich um lineare optische Phänomene. In Abhängigkeit von der Wellenlänge und der Bestrahlungsstärke der elektromagnetischen Welle ( $\text{W}/\text{cm}^2$ ) können jedoch nicht-lineare Phänomene beim Verlauf der Welle innerhalb eines leitenden Mediums hinzukommen. Diese hängen mit der Wechselwirkung der elektromagnetischen Welle mit den Elektronen innerhalb des leitenden Mediums zusammen, wobei die Eigenschaften des Mediums selbst und in diesem Zusammenhang die Bestrahlungsstärke wichtig sind. Die Wechselwirkung kann zu lokalen Änderungen der optischen Eigenschaften (Brechzahl) des Mediums führen. Derartige Veränderungen bezeichnet man als nicht-lineare Optik. Nicht-lineare Phänomene treten bei Bestrahlungsstärken von  $10^2$ - $10^6 \text{ W}/\text{cm}^2$  auf. Derartige Bestrahlungsstärken können durch Laser emittiert werden. Laser zeichnen sich durch die Emission zeitlich-räumlich kohärenter elektromagnetischer Strahlung aus. Die einzelnen Wellenpakete der Strahlung besitzen zudem eine nahezu identische Ausbreitungsrichtung (Parallelität). Obwohl bestimmte Gesetzmäßigkeiten (z.B. Superpositionsprinzip, Frequenzerhaltung) der Ausbreitung elektromagnetischer Wellen in Medien durch die nicht-lineare Optik verletzt werden, können optische Gesetzmäßigkeiten, wie z.B. die Fokussierung von Laserlicht, anhand klassischer optischer Aufbauten erklärt werden. Dies soll im Folgenden geschehen.

### 3.2.1 Geometrische Optik

Die Abbildungen geometrischer Gegenstände können auf unterschiedliche Weise mit Hilfe optischer Aufbauten vergrößert und verkleinert werden. Sehr einfach gelingt dies mit einer Lupe, wobei man hier zur Vergrößerung nur eine optische, bikonvexe Linse benötigt. Das Auge selbst kann Dinge in etwa 25cm Entfernung scharf sehen. Soll ein Objekt mit einer Lupe vergrößert werden, so muss sich das



zu betrachtende Objekt mit der Gegenstandsweite ( $g$ ) innerhalb der Brennweite ( $f$ ) der verwendeten Lupe befinden (siehe Abb.3.1, S.15). Ebenso muss der Abstand des Auges auf der anderen Seite der Lupe  $< f$  sein. Nun wird ein vergrößertes, virtuelles Bild des Gegenstandes wahrgenommen. Die Vergrößerung ( $V_L$ ) ergibt sich aus Gleichung 3.1:

$$V_L = \frac{g + f}{g} = \frac{s_0}{g} \quad (3.1)$$

$f$  = Brennweite,  $g$  = Gegenstandsweite,  $s_0$  = Nahpunkt des Auges (0,25 m)

$V_L$  = Vergrößerung der Lupe

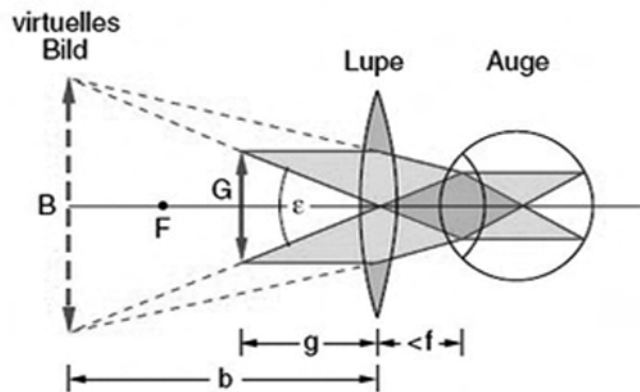


Abbildung 3.1: Geometrische Optik einer Lupe

Strahlengang einer Lupe (dünne Linse). Der Gegenstand (G) muss sich innerhalb der Brennweite ( $f$ ) der Lupe befinden. Das vom Auge wahrgenommene vergrößerte Bild (B) entsteht auf der Seite des Gegenstandes und wird deshalb virtuelles Bild genannt ( $g$ =Gegenstandsweite,  $b$ =Bildweite,  $f$ =Brennweite Augenlinse,  $\epsilon$ =Sehwinkel). siehe Gleichung 2.6 (Demtröder, 2008)

Zur Vergrößerung von in der Ferne befindlichen Gegenständen kann man z.B. ein Kepler'sches-Fernrohr verwenden. Hierfür werden zwei konvexe Linsen ( $L_1$ ,  $L_2$ ) verwendet, die unterschiedliche Brennweiten aufweisen. Die erste Linse ( $L_1$ ) erzeugt dabei ein reelles Zwischenbild, das mit der zweiten Linse ( $L_2$ ), die als Lupe fungiert, vergrößert betrachtet wird. Die Gesamtvergrößerung eines Teleskops ergibt sich aus Gleichung 3.2.

$$V_F = \frac{B}{f_2 \epsilon_0} = \frac{f_1 \epsilon_0}{f_2 \epsilon_0} = \frac{f_1}{f_2} \quad (3.2)$$

$f_1$  = Brennweite  $L_1$ ,  $f_2$  = Brennweite  $L_2$ ,

$B$  = Bildgröße,  $V_F$  = Vergrößerung des Teleskops,

$\epsilon_0$  = Winkel des auftreffenden Lichts vom Objekt (wird durch dessen Ausmaße bestimmt)

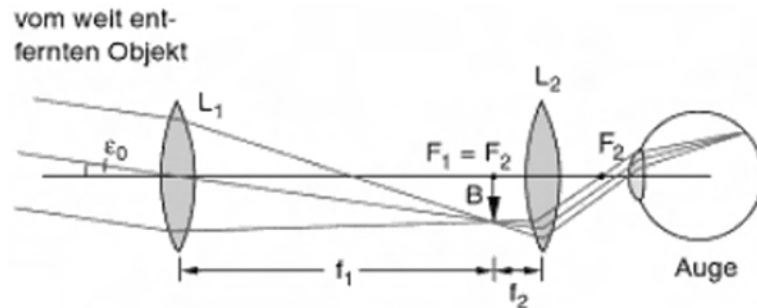


Abbildung 3.2: Geometrische Optik eines Kepler'schen Fernrohrs  
Strahlengang in einem Kepler'schen Fernrohr (Linsensystem,  $L_1$ =Linse 1,  $L_2$ =Linse 2). Das durch den in großer Entfernung befindlichen Gegenstand ausgesendete Licht trifft in einem Winkel  $\epsilon_0$ , der durch die Ausmaße des Gegenstandes festgelegt wird, auf  $L_1$  auf. Das durch  $L_1$  erzeugte reelle Zwischenbild (B) wird durch  $L_2$ , die wie eine Lupe wirkt, vergrößert.  $f_1$  und  $f_2$  liegen übereinander. (Demtröder, 2008)

Das Prinzip des Kepler'schen Fernrohrs bzw. Teleskop-Prinzip wurde auch in der neu entwickelten AP-SMALDI Ionenquelle verwendet. Dabei wurden zwei Aufbauten verwendet: 1) eine Vorfokussierlinse und das Laserobjektiv, was in dieser Arbeit als einstufige Voroptik bezeichnet wird und 2) zwei Vorfokussierlinsen und das Laserobjektiv, was in dieser Arbeit als zweistufige Voroptik (Teleskopaufbau) bezeichnet wird (siehe Kapitel 5.1.8, S.118). Die „Vergrößerung“, im Sinne des Laserfokussdurchmessers, wurde im AP-SMALDI Aufbau durch Veränderung der Laserintensität variiert (siehe Kapitel 3.3, S.18)

**Rayleigh Länge:** Die axiale Ausdehnung des Fokus wird mit der Rayleigh-Länge bezeichnet (siehe Abb. 3.3, S.17). Die Ausdehnung der Rayleigh-Länge ergibt sich aus Gleichung 3.3. Für den AP-SMALDI Aufbau ergibt sich damit, für eine Bildgröße von  $\approx 2 \mu\text{m}$ , eine Rayleigh-Länge von  $37 \mu\text{m}$ . Dies hat Konsequenzen für die Untersuchung erhabener, also strukturierter Proben. Sind die Niveauunterschiede im Relief der Probe größer als die Rayleigh Länge, kommt es zu Änderungen der Bestrahlungsdichte und Fokusgröße. Die Folge können Veränderungen der lateralen Auflösung und der Zahl gebildeter Ionen sein. Neben Schwankungen der Signalintensität, verursacht durch die Präparationshomogenität, kann dies zu zusätzlichen Schwankungen während der massenspektrometrischen Untersuchung führen.

$$Z_R = \frac{\pi w_0^2}{\lambda} \quad (3.3)$$

$w_0$  = Strahlradius im Fokus,  $\lambda$  = Wellenlänge des Laserlichts,

$Z_R$  = Rayleigh-Länge

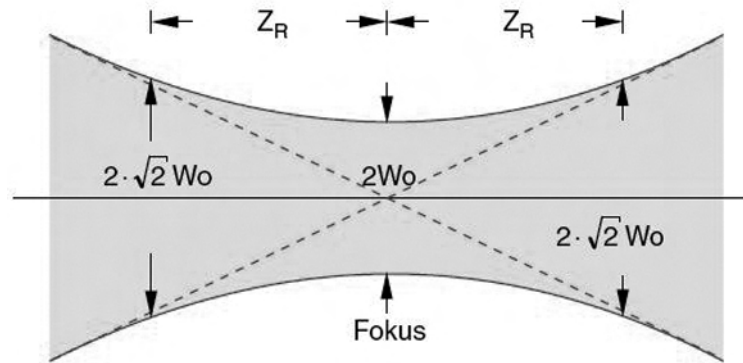


Abbildung 3.3: Rayleigh-Länge (axiale Dimension des optischen Fokus)

Schematische Darstellung der axialen Ausdehnung eines optischen Fokus. Diese wird bestimmt durch  $w_0$  (Durchmesser des Lichtbündels) und  $Z_R$  (Abstand bis der Durchmesser auf  $2\sqrt{2}w_0$  angewachsen ist). (Demtröder, 2008)

Sowohl der Aufbau mit einstufiger Voroptik als auch mit zweistufiger Voroptik (Teleskopoptik) wurden bei der Entwicklung der neuen Ionenquelle getestet. Ein Aufbau ähnlichen Prinzips wie der mit zweistufiger Voroptik wurde bereits von Spengler et al. (1988) verwendet. Hierbei werden zwei bikonvexe Vorlinsen verwendet, die sich im Abstand  $f_1 + f_2$  zueinander befinden. Ihre Brennpunkte liegen also übereinander. Ein paralleler Licht-/Laserstrahl, der diesen Aufbau passiert, wird zwischen den beiden Linsen fokussiert und verlässt die zweite Linse wieder als paralleler Strahl. Durch Kombination von Vorlinsen unterschiedlicher Brennweiten und Durchmesser kann man parallele Strahlen mit kleineren oder größeren Querschnitten als der Primärstrahl erzielen. Trifft der parallele Strahl der zweiten Vorlinse auf eine dritte konvexe Linse (im AP-SMALDI Aufbau das Laserobjektiv), so wird er dort genauso stark wie der divergente Strahl bei einstufiger Voroptik gebrochen. Der Brennpunkt des Objektivs rückt deshalb, im Vergleich zum Aufbau mit einstufiger Voroptik, näher an dieses heran. Diesen Effekt kann man noch weiter verstärken indem man die beiden Vorfokussierlinsen weiter als die Summe ihrer Brennweiten auseinander positioniert ( $f_1 + f_2$ ). Dann verlässt ein schwach konvergierender Strahl die zweite Linse. Trifft dieser auf das Objektiv so rückt der Brennpunkt des nochmals näher an

dieses heran (Details siehe Kapitel 5.1.8, S.118). Auch mit Teleskopoptik wurde die „Vergrößerung“, im Sinne des Laserfokusbereichs, durch Veränderung der Laserintensität variiert (siehe Kapitel 3.3, S.18).

### 3.3 Laserenergie und Laserfokusbereich

Häufig werden bei UV-MALDI *flat top*-Laserprofile verwendet. Diese erzielt man durch Transport des Laserstrahls durch eine geeignete Glasfaser. Die aus der Glasfaser austretenden Laserstrahlen weisen im Profil eine homogene Energieverteilung auf. Das originäre Laserprofil ist hierbei irrelevant, da es zu einer „Homogenisation“ des Laserstrahls in der Glasfaser kommt. Bei Laserstrahlen, die durch optische Linsen und Spiegel gelenkt werden, unterbleibt diese Homogenisation. Hier bleibt die Inhomogenität der Energieverteilung im originären Laserstrahl bestehen. Diese entspricht im Idealfall einer Gauß'schen Glockenkurve (siehe Abb.3.4, S.19), mit der größten Energiedichte im Zentrum des Laserstrahls. Ein ideales Gauß-Profil wird als TEM<sub>00</sub> Strahl bezeichnet.

**Optischer Laserfokusbereich:** Mit sogenannten *beam-profiler* Apparaturen kann man die Energiedichteverteilung im Laserstrahlquerschnitt sichtbar machen (siehe Kapitel 4.3, S.72). Die Energiedichte, bei näherungsweise gaußförmigen Laserstrahlen, nimmt vom Zentrum aus radial ab. Setzt man einen energetischen Grenzwert, in Bezug auf die höchste Energiedichte im Zentrum des Strahles, auf den die Energie zum Rand hin abgesunken ist, so ergibt sich ein entsprechender Durchmesser des Laserstrahls. Ein Kriterium ist z.B. das Absinken der Laserenergie auf den  $1/e^2$ -ten Teil der maximalen Energie im Zentrum. In Abbildung 3.4 (S.19) wird dies als  $1/e^2$  Schwelle bezeichnet. Sie definiert den optischen Laserfokusbereich.

**Desorptions-Laserfokusbereich:** Im Gegensatz hierzu steht der Desorptions-Laserfokusbereich. Dieser ergibt sich aus den chemisch-physikalischen Eigenschaften der Probe, wie spektrale Absorption/Absorptionskoeffizient, Kohäsion/Adhäsion innerhalb der Probe, usw.. Diese Eigenschaften der Proben-substanz bewirken die Desorption und Ionisation ab einer bestimmten Energiedichte. Dieser diskrete Energie-Dichtewert wird als Desorptions-/Ionisationsschwelle bezeichnet. Diese Desorptions-/Ionisationsschwelle befindet sich also demnach an einer probenspezifischen Stelle der in Abb.3.4 (S.19) gezeigten Glockenkurve. Bei räumlicher Betrachtung der Glockenkurve entspricht dies einem Schnitt durch die Kurve und somit einer Querschnittsfläche. Die Schnittebene bestimmt

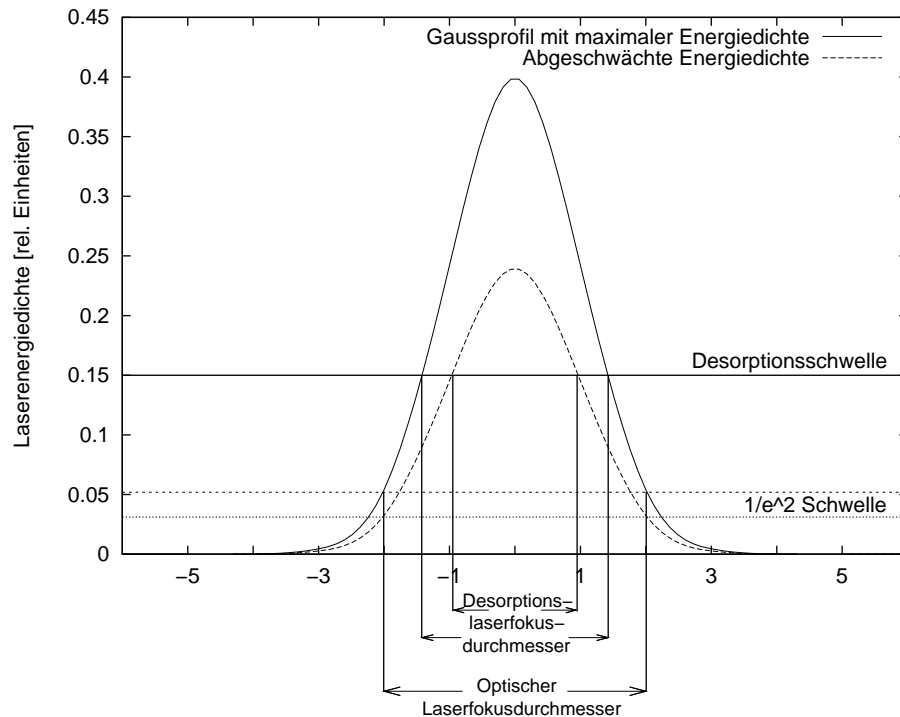


Abbildung 3.4: Energiedichteverteilung im Laserstrahl und Abschwächung der Laserenergie

Energiedichteverteilung (engl.: *laser fluence*) eines Laserstrahles mit Gaußprofil ( $\text{TEM}_{00}$ -Profil) und eines abgeschwächten Laserstrahls. Die beiden horizontalen Grenzen ( $1/e^2$ -Schwelle) verdeutlichen den  $1/e^2$ -Wert des Energiemaximums der beiden Kurven. Eine weitere Grenze (Desorptionsschwelle) beschreibt die Höhe der spezifischen Desorptionsschwelle eines gegebenen Analyten. Durch Abschwächung nimmt der Radius des Desorptions-Laserfokussdurchmessers ab.

somit die Größe des Desorptions-Laserfokussdurchmessers spezifisch für eine zu messende Substanz.

Was bewirkt nun also eine Veränderung der Laserenergiedichte durch Abschwächung?

Schwächt man den Laserstrahl durch geeignete optische Filter ab, so ändert sich die Energiedichte im Laserstrahlquerschnitt. Die Schwellenenergie zur Desorption der Probe bleibt jedoch konstant. Mit sinkender Energiedichte im Laserstrahlquerschnitt wird die probenspezifische Schnittebene auf der Gauß-Kurve immer kleiner. Da die Glockenkurve zur Spitze hin eine kleinere Querschnittsfläche aufweist, verringert sich somit der Fokussdurchmesser, bei dem noch der Schwellenenergiebetrag gegeben ist. In Abbildung 3.4 (S.19) werden die beiden Kurven als maximale Energiedichte und abgeschwächte Energiedichte bezeichnet. Bei dieser Form der Veränderung des Laserfokussdurchmessers

ist jedoch folgendes zu beachten: da die Querschnittsfläche des Laserstrahlquerschnitts (Schnittebene der Gauß-Kurve) im Quadrat sinkt oder steigt, der Energiebetrag der Laserenergie jedoch nahezu linear, führt dies schnell zu einer Fehlberechnung der Energiedichte (engl.: *fluence*), wenn die üblichen Einheiten  $\text{W}/\text{cm}^2$  oder  $\text{J}/\text{m}^2$  verwendet werden. Die quadratische Änderung der Fläche überkompensiert lineare Laserenergieänderungen, so dass es zu Über- oder Unterschätzungen der Strahlungsdichte kommt. Deshalb ist es sinnvoller, statt einer flächenbezogenen Größenordnung, allein die deponierte Pulsenergie ([J]) anzugeben.

### 3.3.1 Räumliche (laterale) Auflösung

Massenauflösung und Massengenauigkeit sind Parameter, die den Massenanalysator näher spezifizieren. Die laterale Auflösung ist hingegen ein Parameter, der die Güte der Ionenquelle näher bestimmt. Trotzdem spielt die Empfindlichkeit des Massenanalysators indirekt eine determinierende Rolle, bei der erreichbaren lateralen Auflösung. Wird die laterale Auflösung zu hoch und damit die Desorptionssort zu klein, so entstehen u.U. so wenige Ionen, dass die Empfindlichkeit des Massenanalysators nicht ausreicht, um diese zu erfassen.

Die laterale Auflösung der Optik einer SMALDI Ionenquelle kann auf unterschiedliche Weise charakterisiert werden. Als Kriterium kann hier zum einen der optische Laserfokusedurchmesser, auf der Basis einer ausgewählten Energieschwelle ( $1/e^2$ -Kriterium), verwendet werden. Zum anderen können die während der Messung auf der Probe erzeugten Desorptionsareale (Brennfleck, engl.: *burn pattern*) zur Bestimmung der lateralen Auflösung herangezogen werden. In der Praxis erweist sich die Charakterisierung über Brennflecken als Größe, die unmittelbar über mikroskopische Beobachtung erfassbar wird. Die Brennflecken stellen eine gute Näherung für den Desorptions-Laserfokusedurchmesser dar. Die Dichte der Desorptionsorte auf der Probe sollte den Abstand  $2r$  ( $r$  = Radius Brennfleck) nicht unterschreiten, um sicher zu stellen, dass keinerlei Überlappung der Desorptionsorte entsteht (engl.: *oversampling*, Jurchen et al. (2005)). Weitere Informationen zum optischen Laserfokusedurchmesser und Desorptions-Laserfokusedurchmesser sind im Ergebnisteil aufgeführt (siehe Kapitel 5.3.1, S.128 und Kapitel 5.3.2.1.1, S.129).

## 3.4 Massenspektrometrie

Die Geschichte der Massenspektrometrie ist etwa 110 Jahre alt, die Geschichte speziell der bildgebenden Massenspektrometrie etwa 30 Jahre. Zum besseren

Verständnis der Zielsetzungen und Hintergründe dieser Arbeit in Bezug auf die Untersuchung der Verteilung von Komponenten auf Oberflächen und deren Visualisierung, z.B. in der Diagnostik Seeley und Caprioli (2008), müssen zunächst wichtige Begriffe und Definitionen der Terminologie der Massenspektrometrie eingeführt werden. Dabei werden die Begriffe Massenauflösung und Massengenauigkeit, sowie deren Bedeutung für die Massenspektrometrie innerhalb der Lebenswissenschaften, erklärt. Darauf folgend werden allgemeine und spezielle apparative Aspekte und Vorstellungen zur Desorption und Ionenentstehung durch MALDI erläutert. In Kapitel 3.6 (S. 52) wird die speziell die bildgebende Massenspektrometrie (engl.: *imaging*) thematisiert.

### 3.4.1 Grundlegende Begriffe der Massenspektrometrie

#### 3.4.1.1 Massenauflösung

Mit der Massenauflösung bezeichnet man die Eigenschaft eines Massenspektrometers zwei unmittelbar benachbarte  $m/z$ -Verhältnisse noch getrennt darstellen und damit auflösen zu können. Generell ergibt sich das Massenauflösungsvermögen  $R$  aus Gleichung 3.4, wobei  $\Delta m$  durch unterschiedlich definierte Kriterien ermittelt wird.

$$R = \frac{m}{\Delta m} = \frac{m}{m_2 - m_1} \quad (3.4)$$

$m$  = Masse des Ions [u]

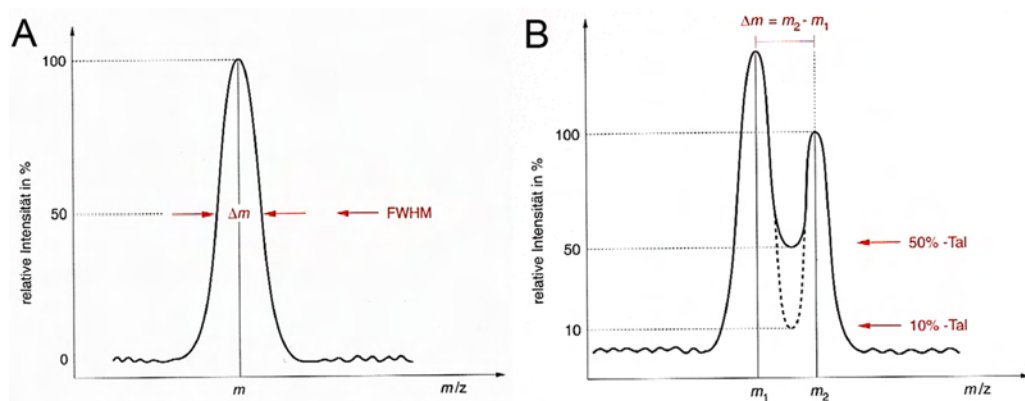


Abbildung 3.5: Massenauflösung

Unterschiedliche Definitionen zur Bestimmung von  $\Delta m$  aus Massenspektren: (A) FWHM-Kriterium, (B) 50 %- bzw. 10 %-Kriterium.  $\Delta m$  wird zur Berechnung der Massenauflösung ( $R = m/\Delta m$ ) benötigt (aus Lottspeich und Zorbas (1998)).

**FWHM-Kriterium:** Das FWHM-Kriterium (engl.: *full width at half maximum*) bezieht sich bei der Ermittlung von  $\Delta m$  auf einen einzigen Peak im Massenspektrum. Von diesem wird die Breite an der Stelle der halben Höhe ermittelt und ins Verhältnis zur  $m/z$ -Position im Spektrum gesetzt.

**50 %- bzw. 10 %-Kriterium:** Beim 50 %- bzw. 10 %-Kriterium werden zur Bestimmung von  $\Delta m$  zwei Peaks im Massenspektrum benutzt. Sie gelten noch als aufgelöst, wenn das Tal zwischen den beiden Peaks 50 % bzw. 10 % der Gesamthöhe des kleineren Peaks beträgt.

**Massenauflösung bezogen auf die Einheitsmasse  $m/z$  400:** Eine durch den Hersteller des LTQ-FT verwendete Definition der Massenauflösung erfolgt durch den Bezug auf die Einheitsmasse  $m/z$  400. Dabei handelt es sich um ein modifiziertes FWHM-Kriterium zur Ermittlung von  $\Delta m$ . Der direkte Vergleich der Massenauflösung unterschiedlicher Massenspektrometer wird dadurch vereinfacht, da sich die Peakbreite mit zunehmendem  $m/z$  verändert. Man bezieht sich deshalb auf ein konstantes  $m/z$  Verhältnis. Eine Auflösung von 100000 bedeutet, dass die Peakbreite bei halber Höhe 0,004 Da beträgt.

Tabelle 3.1: MASSENANALYSATOREN

Übersicht verwendeter Massenanalysatoren und deren Massenauflösung.

Massenanalysator	Kriterium	mögliche Massenauflösung
TOF (linear)	FWHM	bis 1000
TOF (Reflektor)	FWHM	bis 15000
Lineare Ionenfalle (LTQ)	FWHM (400)	2000-8000
LTQ-FT	FWHM (400)	25000-1000000

### 3.4.1.2 Massengenauigkeit

Ergänzend zur Massenauflösung dient die Massengenauigkeit zur näheren Spezifikation von Massenanalysatoren bzw. Massenspektrometern. Sie gibt Auskunft darüber, wie korrekt ein Massenspektrometer ein bekanntes  $m/z$ -Verhältnis messen kann. Die Abweichung vom theoretischen Wert wird häufig in ppm (engl.: *parts per million*) angegeben. Experimentelle Bestimmungen der Massengenauigkeit der LTQ ergaben einen Wert von etwa 120 ppm Abweichung zum theoretischen  $m/z$ -Verhältnis. Die Spezifikationen des Herstellers für das LTQ-FT im *Full Mass Range*-Modus liegen bei <2 ppm (Thermo Electron Corporation, 2004). Das LTQ-FT Ultra ist in dieser Betriebsart mit <1,2 ppm spezifiziert (Thermo Electron Corporation, 2006c).



Tendentiell gilt: je höher die Massenauflösung, desto besser kann die Massengenauigkeit bestimmt werden. Beide Parameter sind jedoch unabhängig voneinander.

### 3.4.2 Grundzüge der Funktionsweise eines Massenspektrometers

Die Grundsteine der Massenspektrometrie wurden gegen Ende des 19. Jahrhunderts gelegt. Bei der Massenspektrometrie handelt es sich um ein analytisches Verfahren, das in der Lage ist, das Masse-zu-Ladung Verhältnis ( $m/z$ ) einer Substanz oder genauer eines Ions der Substanz zu bestimmen. Die Massenspektrometrie ist im Bereich der analytischen Chemie eine der empfindlichsten Methoden überhaupt. Untersuchungen mit absoluten Probenmengen im femto- bis attomol-Bereich können durchgeführt werden. Dabei sind bei komplexeren Molekülen auch Strukturaufklärungen möglich. Andere analytisch-strukturaufklärende Verfahren wie z.B. die NMR-Spektroskopie benötigen in der Anwendung deutlich größere Probenmengen. Voraussetzung für eine massenspektrometrische Untersuchung ist die Verdampfung und Ionisation von Atomen bzw. Molekülen. Je nach Ionisationsmethode entstehen dabei positive und/oder negative Ionen. Da die massenspektrometrische Analyse über eine Manipulation der entstandenen Ionen in magnetischen oder elektrostatischen Feldern erfolgt, müssen ggfs. die Vorzeichen der Felder invertiert werden, um die eine oder andere Ionenspezies (positive oder negative Ionen) nachweisen zu können. Die Messung positiver Ionen stellt in den unterschiedlichen Anwendungsgebieten der Massenspektrometrie den größten Anteil dar.

### 3.4.3 Aufbau eines Massenspektrometers

Alle Massenspektrometer besitzen prinzipiell einen ähnlichen Aufbau. Sie gliedern sich in fünf Abschnitte:

- Probenzuführung
- Ionenquelle
- Massenanalysator
- Detektor
- Datenaufnahme/Datenauswertung

Die Ionenerzeugung innerhalb der Ionenquelle kann im Hochvakuum, unter Mitteldruck- oder Atmosphärendruckbedingungen erfolgen. Dementsprechend muss die Probenzuführung angepasst werden. Findet die Ionenerzeugung im Hochvakuum statt, so muss ein Zusammenbruch des Vakuums im Massenspektrometer während der Probenzuführung durch eine Vakuumschleuse verhindert werden. Im Gegensatz hierzu gibt es sogenannte Atmosphärendruck-Ionenquellen (engl.: *atmospheric pressure*, AP). Bei diesem Quellentyp kann die Probenzuführung einfach gehalten werden. Die Ionen gelangen durch ein spezielles Ionentransfersystem mit differentiell gepumpten Bereichen in das Massenspektrometer. Dieses hat zum einen die Aufgabe effizient Ionen zum Massenanalysator zu transferieren, zum anderen muss es das differentielle Vakuum aufrecht erhalten. Weitere Aspekte unterschiedlicher Ionenquellenvarianten sind in Kapitel 3.4.3.1 (S.25) aufgeführt.

Der Bereich in dem die Massenanalyse und die Detektion der entstandenen Ionen stattfindet sind permanent im Vakuum. Dabei unterscheidet sich die Güte des Vakuums bei unterschiedlichen Massenanalysatoren. Während Quadrupol-Ionenfallenmassenspektrometer ein Vakuum in der Größenordnung  $10^{-5}$  bis  $10^{-6}$  mbar aufweisen, besitzen FT-ICR Massenspektrometer ein deutlich höheres Vakuum von  $10^{-9}$  bis  $10^{-10}$  mbar (aus Jouston und Wutz (2006); S. 743, Abb. 17.33). Unter der Vielzahl an unterschiedlichen Massenanalysatoren soll im weiteren Verlauf auf zwei Typen näher eingegangen werden (siehe Kapitel 3.4.5, S. 40).

Dabei bedarf es sensitiver Detektionssysteme, um derart kleine Probenmengen detektieren zu können. In der Regel erreichen nur einige zehntausend Ionen den Detektor. Dieses primäre Signal kann auf unterschiedliche Weise elektronisch verstärkt werden. Die elektronische Verstärkung ist Voraussetzung für die Signalwandlung und spätere Datenverarbeitung. Die Datenaufnahme und -speicherung findet heutzutage bei kommerziell erhältlichen Geräten ausschließlich mit Hilfe von Personal Computern (PC) statt. Die Rolle früher häufig üblicher Transientenrekorder (z.B. ein digitales Speicheroszilloskop) für die Umwandlung eines analogen Messsignals in ein binäres, durch den PC verwertbares Signal, ist heute in die Elektronik des Massenspektrometers integriert bzw. kann durch PC Steckkarten übernommen werden. Die Kommunikationsschnittstellen moderner Massenspektrometer geben i.d.R. direkt binäre Daten aus.

### 3.4.3.1 Ionenquellen

In der Geschichte der Massenspektrometrie wurde bisher eine große Anzahl an Methoden entwickelt, um Moleküle unterschiedlichster Substanzklassen zu ionisieren und sie dadurch einer massenspektrometrischen Analyse zugänglich zu machen. In Abhängigkeit von den jeweiligen chemisch-physikalischen Eigenschaften der Analyten muss ein geeignetes Ionisierungsverfahren angewendet werden. Die ersten Ionisierungsverfahren, die entwickelt wurden, ionisieren unter vergleichsweise chemisch-physikalisch härteren Bedingungen. Mit ihnen können anorganische oder niedermolekulare, polare und apolare organische Atome/Moleküle untersucht werden. Bei Zunahme der Molekülmasse der Analyten erfolgt deren verstärkte Fragmentierung. Einige der vergleichsweise härteren Ionisierungsverfahren (Beckey, 1963, 1969; Barber et al., 1981; Berkel, 2003) sind nachfolgend im Überblick aufgeführt:

- Electron Ionisation (EI)
- Chemical Ionisation (CI)
- Fast Atom Bombardment (FAB)
- Laser Desorption Ionisation (LDI)
- Field Desorption (FD), Field Ionisation (FI)
- Atmospheric Pressure Photo Ionisation (APPI)

Mit zunehmender Bearbeitung biologischer Fragestellungen bestand Bedarf an Ionisierungsverfahren, die den Anwendungsbereich der Massenspektrometrie in dieser Hinsicht erweiterten. Ziel der Entwicklung war es unspezifische Fragmentierung des Analyten zu vermeiden. Dafür wurden die sogenannten weichen Ionisierungsverfahren entwickelt. Bei der Ionisation mit diesen weichen Ionisierungsverfahren entstehen Quasimolekülionen (Ladungserzeugung durch Anlagerung oder Entfernung von Kationen). Voraussetzung zur Erzeugung dieser Quasimolekülionen sind polare Analytsubstanzen. Die elektronische Konfiguration des Moleküls wird dabei also nicht verändert, Ladung wird ausschließlich durch Anlagerung oder Entfernung kleiner Ionen erzeugt. Hierdurch ändert sich die Masse des Quasimolekülions um den Betrag der Eigenmasse des angelagerten Ions. Die beiden wichtigsten weichen Ionisationsmethoden sind (Yamashita und Fenn, 1983; Karas und Hillenkamp, 1988):

- Electrospray Ionisation (ESI)

- Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation (MALDI)

Einige der oben genannten Ionisierungsverfahren können ausschließlich mit einer Hochvakuum Ionenquelle durchgeführt werden (z.B. FAB, EI), manche können nur im Atmosphärendruckbereich betrieben werden (z.B. ESI, AP-CI) während bei der Benutzung von LDI oder MALDI sowohl Hochvakuum-, Mitteldruck- und Atmosphärendruckquellen benutzt werden können (O'Connor und Costello, 2001; Moyer et al., 2003; Kellersberger et al., 2004). Ein Überblick über einige Atmosphärendruck Ionenquellen wird bei Bruins (1991) gegeben.

Einige wissenschaftliche Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass Hochvakuum-Ionenquellen eine höhere Empfindlichkeit, im Vergleich zu Mitteldruck- bzw. Atmosphärendruck Ionenquellen aufweisen, da Ionentransferverluste niedriger sind (Laiko et al., 2000a,b). Mitteldruck- bzw. Atmosphärendruck Ionenquellen bieten jedoch andere Vorteile. Mitteldruckionenquellen, die z.B. nach dem Prinzip arbeiten, dass gepulst Inertgas während des Desorptions/Ionisationsprozesses in den Quellenraum gegeben wird (O'Connor und Costello, 2001) oder komplett unter Atmosphärendruck arbeitende Ionenquellen zeigen deutlich niedrigere Tendenzen in Bezug auf die unspezifische Fragmentierung von Analytationen (Laiko et al., 2000b; Doroshenko et al., 2002; Kellersberger et al., 2004). Weiterhin ist es möglich schnell zwischen unterschiedlichen Proben zu wechseln, ohne dass es zum Zusammenbruch des Vakuums im restlichen System kommt. Pump- bzw. Pausenzeiten werden so vermieden. Ein weiterer entscheidender Vorteil, im Vergleich zu Hochvakuumquellen, liegt in der Möglichkeit leichtflüchtige Proben ausreichend lange oder gar überhaupt erst untersuchen zu können. Dies ermöglicht z.B. die Untersuchung von Gewebeschnitten ohne aufwendige Trocknung (Garrett und Yost, 2006)

#### 3.4.4 Laser und lasergestützte Ionenerzeugung

Im Folgenden soll auf die lasergestützten Methoden zur Ionenerzeugung näher eingegangen werden. Diese sind für das Verständnis dieser Arbeit von grundlegender Bedeutung. Laserlicht (engl.: *light amplification by stimulated emission of radiation*) stellt eine erst seit einigen Jahrzehnten verfügbare Form elektromagnetischer Strahlung dar, die einige Besonderheiten im Vergleich zu herkömmlichem Licht aufweist (siehe Kapitel 3.2, S.14). Das von einem Laser emittierte Licht ist kohärent (phasengleich), nahezu monochromatisch und die emittierten Quanten weisen meist eine nahezu identische Ausbreitungsrichtung auf (Parallelität). Die Leistungsdichte eines Lasers kann deshalb um Größenordnungen größer sein, als die einer normalen Lichtquelle. Laser werden nach

ihrer Wellenlänge, Pulsdauer, Energiedichte, etc. unterschieden. Die Pulsdauer der emittierten Laserpulse unterscheidet Laser voneinander. Laser können gepulste Strahlungsemission erzeugen (Femtosekunden bis Millisekunden), es existieren jedoch auch kontinuierlich emittierende Laser. Kommerziell werden ultraviolett (UV), sichtbares Licht (VIS) und infrarot (IR) emittierende Laser angeboten, deren Aufbau jedoch prinzipiell ähnlich ist. Der Hauptunterschied bei unterschiedlichen Lasern liegt in der Frequenz mit der Laserpulse emittiert werden können (Repetitionsrate). Prinzipiell ähnliche Bauteile sind:

- Pumpsystem (Blitzlampe, Diode, etc.)
- Resonator mit Lasermedium (Festkörper, Gas)
- Resonatorspiegel
- Elektronik (Pockelszelle, Güteschalter)

Man unterscheidet, je nach dem Aggregatzustand des Lasermediums z.B. zwischen Gas- und Festkörperlaser. Festkörperlaser können eine um ein vielfaches höhere Repetitionsrate erzielen als Laser mit gasförmigem Lasermedium (z.B. N<sub>2</sub>-Laser). Weiterhin kann sich der Aufbau eines Lasers in der Art der Anregung des Lasermediums unterscheiden. Hier kann durch Blitzlampen, Dioden, Hochspannung oder andere Laser angeregt werden.

Qualitative Kriterien für einen Laser sind die sogenannte Strahldivergenz und der m<sup>2</sup>-Wert. Die Divergenz ([rad]) ist ein Maß für die Parallelität des durch den Laser emittierten Laserstrahls. Die Divergenz ist eine Nahfeldgröße. Der m<sup>2</sup>-Wert hingegen wird durch Messungen im Fernfeld, nach vorheriger Fokussierung des Lasers, ermittelt. Beide beschreiben die Parallelität des emittierten Laserstrahls. Für laseroptische Betrachtungen ist die Homogenität des emittierten Laserstrahls ebenfalls wichtig. Sie bestimmt die Energiedichteverteilung im unfokussierten und fokussierten Laserstrahl. Darüber hat die Homogenität Einfluss auf die homogene oder inhomogene Desorption von Probenmaterial von der Oberfläche einer Probe. Die Homogenität des Laserstrahls wird durch den Aufbau und die Länge des Resonators, das Lasermedium und die Resonatorspiegel bestimmt. Je nach Aufbau erhält man eine unterschiedliche Energieverteilung im Laserstrahlquerschnitt. Daraus ergibt sich, dass Kohärenz und Monochromatizität eines Laserstrahls, zumindest bei kommerziellen Lasern, nicht erreichbar sind. Als Referenz des idealen Laserstrahls wird der sogenannte TEM<sub>00</sub> Laserstrahl angegeben. Dieser Laserstrahl weist eine ideale, gaußförmige Energieverteilung auf (siehe Abb.3.4, S. 19). Ein wichtiger Aspekt eines derartigen Laserstrahls wird in dieser Grafik verdeutlicht. Weitere Aspekte

des Laserstrahlquerschnitts werden in Kapitel 3.3.1 (S. 20) behandelt. Vertiefendes in Bezug auf Lasertechnik kann in Siegman (1986) nachgelesen werden.

So wirkungsvoll die hohe Energiedichte (engl.: *fluence*) des Lasers bei biologischen Materialien, im Sinne ihrer zerstörerischen Wirkung sein kann, so effektiv kann sie jedoch für die Erzeugung von Ionen unter unterschiedlichsten Bedingungen angewendet werden. Wichtig für die Erzeugung von Ionen durch einen Laserstrahl ist die Eigenschaft der Probe (engl.: *target*), das Laserlicht zu absorbieren. Hierbei treten in der Probe unterschiedliche Phänomene in zeitlicher Reihenfolge auf, die im Folgenden näher beschrieben werden. Zunächst muss Desintegration eines Teils der Probe durch den Laser erfolgen. Die dabei entstehenden Teilchenwolke/Partikelwolke (engl.: *plume*) enthält bereits Ionen oder diese entstehen sekundär in der Gasphase. Die Ionen können später massenspektrometrisch analysiert werden (Dreisewerd, 2003).

#### 3.4.4.1 Laser Desorption/Ionisation (LDI)

Charakteristisch für die LDI Analyse ist, dass die Probe selbst den Laserstrahl absorbiert. Es werden keinerlei Hilfssubstanzen verwendet. Dies bedeutet einen sehr großen Vorteil für die Untersuchung mittels LDI, da die Probe nicht verändert bzw. modifiziert werden muss. Der Nachteil dabei ist allerdings, dass häufig nur niedermolekulare, lichtabsorbierende Moleküle bzw. Ionen untersucht werden können, da die in der Probe deponierte Energiemenge zu starker Fragmentierung größerer Moleküle führt. Aktuelle Anwendungen von LDI verwenden größere Probenoberflächen, so dass eine Untersuchung biologisch wichtiger Moleküle, auch in einem größeren Massenbereich (bis  $m/z$  3500 Da), möglich wird (Peterson, 2006). Bei bestimmten organischen Makromolekülen, wie z.B. Huminsäurederivaten, ist auch eine Untersuchung größerer Moleküle möglich (Chilom et al., 2008).

Grundsätzlich wird durch Laserbeschuss einer Probe, je nach Emissionsleistung des Lasers und Dauer des Laserpulses, eine große Energie in sehr kurzer Zeit deponiert. In Abhängigkeit von der Laserenergie und der Laserpulsdauer treten nachfolgend unterschiedliche Phänomene auf. Die Energie entscheidet darüber, ob eher eine thermische Verdampfung der Probe, eine Probenablation durch Phasenexplosion oder ein Plasma auftritt. Sowohl bei der Phasenexplosion als auch bei Bildung eines Plasmas kommt es, zu einer massiven Desintegration der Probe (Hergenröder et al., 2006). Bei mehreren Nanosekunden-Laserpulsen herrschen eher massive thermische Effekte vor (Verdampfen, Pha-

senexplosion), während kürzere Pulse ( $<1$  ps) eine explosive photomechanische bzw. thermoelastische Ablation zu Folge haben (Miotello und Kelly, 1999; Margetic et al., 2000). Die Pulsdauer bestimmt also, ob es zu einem fest-flüssig-gasförmig Phasenübergang kommt (ns Laserpulse) oder zu einem direkten Phasenübergang fest-gasförmig (ps und kürzere Laserpulse). Zusätzlich spielen physikalische Eigenschaften der Probe, wie Adhäsivität/Kohäsivität, etc., eine Rolle. Die Pulsdauer entscheidet darüber, wie stark die in der Probe deponierte Laserenergie an benachbarte Moleküle weitergegeben werden kann, wie stark also thermische Relaxation und andere Dissipationsmechanismen zum Tragen kommen ( $10^{-11}$ - $10^{-10}$  s nach Strahlungsbeginn) (Margetic et al., 2000; Hergenröder et al., 2006).

Dies spielt gerade bei einer möglichen Zerstörung weicher, biologischer Proben, durch eine LDI Untersuchung, eine erhebliche Rolle (Hergenröder et al., 2006). Intakte Gewebe zeigen in Abhängigkeit von der Bestrahlungsstärke und den absorbierenden Strukturen eine Phasenexplosion, die zur massiven Ablation von Material führt (Überschreitung des Kochpunktes von Wasser). Jedoch können bei geschädigten Geweben enorme Materialmenge auch bereits unterhalb dieses Punktes durch schnelles Verdampfen ablatiert werden (Venugopalan, 1995). Auch photomechanischer Stress wurde bei beschossenen Geweben beobachtet. Unter bestimmten Umständen (Laserfluenz, Pulsdauer, Absorptionstiefe) kann in Geweben die Ablation durch einen thermoelastischen Puls, vor thermischer Äquilibration der im betroffenen Volumen befindlichen Moleküle mit ihrer Umgebung, erzielt werden (Dingus und Scammon, 1991).

Bei LDI wurde, für bestimmte Analytklassen, die Existenz von Ionen im Festkörper (engl.: *pre-formed ions*) gezeigt. Diese konnten bei rein thermischer Desorption nachgewiesen werden (van Breemen et al., 1983).

#### **3.4.4.2 Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation (MALDI)**

Die Verwendung von Hilfssubstanzen bei der lasergestützten Untersuchung von Proben, den sogenannten Matrices, ermöglichte etwa in der Mitte der achtziger Jahre des 20. Jahrhunderts zum allerersten Mal Biomoleküle, mit einer Masse größer als 10000 Da, nahezu fragmentierungsfrei zu untersuchen (Karas und Hillenkamp, 1988). Beginnend mit der Beobachtung des Phänomens, dass aliphatische oder aromatische Aminosäuren (Laser-)Licht einer bestimmten Wellenlänge absorbieren oder nicht absorbieren, wurden nachfolgend Untersuchun-

gen an Mischungen von mindestens zwei Aminosäuren durchgeführt. Die Desorption/Ionisation erfolgte mittels eines frequenzvervierten bzw. verdreifachten Nd-YAG Lasers, mit Wellenlängen von 266 nm bzw. 355 nm. Die aromatische Aminosäure Tryptophan (Trp) zeigte bei 266 nm die höchste Absorption, alle weiteren untersuchten Aminosäuren lagen signifikant darunter. Diese niedrige Absorption führte dazu, dass deutlich höhere Bestrahlungsstärken aufgewendet werden mussten, um spezifische Ionensignale bzw. in zunehmendem Maße ionisierte Molekülfragmente zu erhalten. Bei der Untersuchung z.B. einer Mischung aus Tryptophan und Alanin (aliphatische Aminosäure) zeigten sich Ionen des Alanins im Bereich der Bestrahlungsstärke der deutlich stärker absorbierenden Aminosäure Tryptophan. Die Vermutung lag nahe, dass in irgendeiner Weise ein Energie- bzw. Ladungstransfer vom Tryptophan auf das Alanin erfolgt. Dieser ermöglicht es Alanin bei deutlich geringeren Bestrahlungsstärken nachzuweisen, als bei Untersuchungen an reinem Alanin aufgewendet werden müssen. Zum ersten Mal tauchte der Begriff der „Matrix“ im Sinne eines Hilfssubstanzes auf. Dieser ermöglicht es Substanzen, die nicht oder schwach im Bereich des verwendeten Laserlichts absorbieren, intakt zu desorbieren und zu ionisieren (Karas et al., 1985). Alle bis heute im Zusammenhang mit UV-Lasern verwendeten Matrices wurden experimentell gefunden. Als Charakteristikum weisen alle ein aromatisches  $\pi$ -Elektronensystem auf. Unterschiedliche Matrixderivate (z.B. 2,4-DHB; 2,5-DHB; etc.) können sich in ihren chemischen und physikalischen Eigenschaften unterscheiden (Glückmann und Karas, 1999). Einige der heutzutage verwendeten Matrices sind 2,5-Dihydroxybenzoesäure (2,5-DHB; Strupat et al., 1991), Sinapinsäure (3-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)propen-2-säure; Beavis und Bridson, 1993), Nicotinsäure (Pyridin-3-carbonsäure; Karas und Hillenkamp, 1988) und  $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure ((Z)-2-cyano-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-ensäure; Beavis et al., 1992).

Die Matrices, die im festen Aggregatzustand Verwendung finden, werden in sogenannte „harte“ und „weiche“ Matrices unterschieden. Weiche Matrices bewirken bei den Analytsubstanzen weniger Fragmentierungsneigung. Die „Weicheit“ wird dabei durch die Begünstigung adiabatischer Prozesse begründet. Je weicher eine Matrix ist, desto höher ist ihre initiale Ausbreitungsgeschwindigkeit. Eine höhere Initialgeschwindigkeit führe zu schnellerer Abkühlung und damit zu energetischer Stabilisierung (Glückmann und Karas, 1999; Karas et al., 2003). Dieser Effekt zeigte sich schon bei Untersuchungen von Karas et al. (1995) an 3-Hydroxypicolinsäure und Juhasz et al. (1997) an 2,5-DHB und 3-Hydroxypicolinsäure, die beide die vergleichsweise höchsten Ausbreitungs-



geschwindigkeiten zeigten. Matrices sind mehr oder weniger universell für die Untersuchung unterschiedlicher Analytklassen einsetzbar. Besonders universell einsetzbar ist 2,5-DHB.

Die Präparation der Matrices findet klassischerweise, je nach Hydrophilie, in Wasser mit unterschiedlichen Anteilen von Alkohol oder Acetonitril statt. Zu den Matrixlösungen wird häufig, gerade bei Messungen von protonierten Quasimolekülen, eine geringe Menge von Trifluoressigsäure (TFA,  $\approx 0,1\%$ ) zugegeben. Zur Beschreibung des MALDI Prozesses wurden eine Vielzahl von Folgeexperimenten durchgeführt, um daraus Modellvorstellungen zu entwickeln. Diese haben jedoch bis heute zu keinem einheitlichen Ergebnis in Bezug auf die Desorptions- und Ionisationsprozesse geführt.

Seit einiger Zeit werden zusätzlich flüssige, ionische Matrices beschrieben (Armstrong et al., 2001; Turney und Harrison, 2004; Cramer und Corless, 2005; Li et al., 2005). Diese bestehen aus mehreren Komponenten, einer traditionellen MALDI Matrix (häufig  $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure) und einer organischen Base (z.B. N,N-Diethylanilin). Beide Komponenten werden in einer organisch-wässrigen-Lösung benutzt. Die ionischen Matrices führen zu einer gesenkten Fragmentierung des Analyten (Li et al., 2005), müssen aber auch mit höherer Laserbestrahlungsstärke untersucht werden (Armstrong et al., 2001). Flüssige Matrices führen zu einer höheren Probenhomogenität und vermeiden das auftreten sogenannter *sweet spots*. Als *sweet spots* werden Areale der Präparation bezeichnet, die eine besonders hohe/gute Signalintensität zulassen. Diese sind gerade bei inhomogener Präparation, wie sie bei Standard 2,5-DHB Präparationen auftreten, besonders beliebt, müssen jedoch zunächst während der Untersuchung gefunden werden.

Für eine erfolgreiche MALDI Untersuchung müssen laut Dreisewerd (2003) folgende Punkte adäquat durchgeführt werden bzw. erfüllt sein:

- Probenpräparation,
- Desintegration der Probe aus der kondensierten Phase,
- Erzeugung und Separation der entstandenen Ionen und
- Auftrennung der Ionen nach Masse-zu-Ladung Verhältnis, um ein Massenspektrum zu erhalten.

### 3.4.4.3 Desorption und Teilchenausbreitung

Die Desorption von Molekülen aus einer MALDI-Präparation (Matrix-Analyt-Kokristall) kann auf unterschiedliche Weise erfolgen. Handelt es sich bei der MALDI Präparation um einen Festkörper, so gelten prinzipiell ähnliche Gesetzmäßigkeiten wie bei der LDI Untersuchung. Phänomenologisch erkennt man nach dem Beschuss der Probenoberfläche mit einem Laserstrahl eine Ablation von Probenmaterial. Bei MALDI Untersuchungen wird häufig ein Laserprofil mit homogener Energieverteilung im Laserquerschnitt verwendet (*flat top*-Profil, Laserstrahl durch Glasfaser geleitet). Die Ablation kann deshalb, in Abhängigkeit vom Strahlprofil des verwendeten Lasers, flächig bei *flat top*-Profil oder kraterförmig bei (nahe-)gaussförmigem Laserstrahl erfolgen. Über die Auswirkung der Laserfluenz im betroffenen Bereich der Probe und der dabei ablatierten Probenmenge existieren unterschiedliche Ergebnisse. Nach Fournier et al. (2003) und Sonntag et al. (2009) spielt die Fluenz eine untergeordnete Rolle. Zahlreiche andere Untersuchungen zeigen das Gegenteil (Spengler et al., 1988; Johnson und Sundvist, 1991; Dreisewerd et al., 1995; Westmacott et al., 2002; Guenther et al., 2010). Die Form der Desorptionsorte („Krater“) hängt vom Laserprofil und der Laserpulsdauer ab (Schmelzränder bei Laserpulslängen im ns-Bereich). Der Zusammenhang mit der Wahrscheinlichkeit der thermischen Äquilibration der Probe wurde bereits im Kapitel 3.4.4.1 (S.28) beschrieben (Johnson und Sundvist, 1991). Im Gegensatz hierzu vertritt Knochenmuss (2006) die Meinung, dass die Pulsdauer irrelevant in Bezug auf die thermische Energieverteilung ist. Knochenmuss sieht die Matrix als Energiespeicher, die die thermische Äquilibration sicherstellt.

Analog zu den Prozessen beim LDI werden, bei schrittweiser Erhöhung der Bestrahlungsstärke des Lasers, zunächst Teilchen sublimativ von der Probenoberfläche desorbiert. Unter MALDI Bedingungen werden bei niedriger Bestrahlungsstärke zunächst Neutralteilchen sublimiert. Beim Erreichen der Schwellbestrahlungsstärke wird auch hier Material explosiv desintegriert. Dies bildet einen wesentlichen Aspekt für eine ausreichende Ionisation der Probe. Johnson und Sundvist (1991) entwickelten eine mathematische Näherung der Ablations-tiefe aus Eingangsgrößen wie Absorption (analog Lambert-Beer'schem Gesetz) und Bestrahlungswinkel (Gleichung 3.5, S.33). Ebenso wird die Ionisationseffizienz genähert (Gleichung 3.6, S.33). Neben der molekularen Probendichte und der Schwellbestrahlungsstärke sind Absorptionsquerschnitt und Kohäsionsenergie, sowie dissipative Prozesse innerhalb des Probenmaterials von Bedeutung. Die Gleichungen zeigen eine Zunahme der Eindringtiefe bei steigender Bestrahlungsstärke, in Abhängigkeit von der Bestrahlungswellenlänge und eine

Zunahme der, nach der Desorption entstehenden Ionenmenge proportional zu deren Entstehungswahrscheinlichkeit, Probendichte, bestrahlter Probenfläche und Ablationstiefe.

$$\Delta z_T \approx (\lambda_e \cos \theta) \ln \left[ F \frac{\Phi}{\Phi_0} \right] \quad (3.5)$$

$$Y_i \approx P_i n_M \Delta A_i \Delta z_i \quad (3.6)$$

$Y_i$  = relative Ionenmenge,  $P_i$  = Ionen-Entstehungs- und  
-Erhaltungswahrscheinlichkeit,  $(n_M)$  = molekulare Dichte der Probe,  
 $\Delta A$  = Ablationsfläche,  $\Delta z_i$  = Ablationstiefe,  
 $\Delta z_T$  = durchschnittliche Ablationstiefe,  
 $\lambda_e \cos \theta$  = Bestrahlungsstärke/-wellenlänge und Einfallswinkel,  
 $\ln[F (\Phi/\Phi_0)]$  = absorbierte Photonenmenge,  
 $\Phi_0$  = Schwellbestrahlungsstärke

Ähnlich dem LDI entstehen, in Abhängigkeit von der Pulslänge des Lasers, zwei grundsätzlich unterschiedliche Stressformen in der Probe: photomechanischer und thermischer Stress (Dreisewerd, 2003; Hergenröder et al., 2006). Untersuchungen zur Temperatur in der Matrix unter Atmosphärendruck, die durch die Energiedeposition des Laserpulses erzeugt wird, zeigen, dass z.B. in der Matrix 2,5-DHB Temperaturen von 850-1100 K erreicht werden. Dies ist abhängig von der eingestrahlten Laserfluenz. Sublimation dieser Matrix beginnt allerdings schon bei Temperaturen um  $\approx 500$  K (Koubenakis et al., 2004; Jaskolla und Karas, 2008). In welcher Form die explosive Desintegration der Probe stattfindet und welche Teilchen dabei gebildet werden wird nach wie vor diskutiert. In Abhängigkeit von den Bedingungen im Bereich der Ionenquelle können experimentell sowohl Makropartikel (Cluster), als auch singuläre Neutralteilchen und Ionen beobachtet werden bzw. Ionen entstehen durch den Zerfall der Cluster (Spengler et al., 1987; Hankin und John, 1999; Karas und Krüger, 2003; Knochenmuss und Zenobi, 2003). Cluster-Bildung/-Erhaltung tritt vor allem bei Mittel- oder Atmosphärendruck (AP)-Ionenquellen auf. Hier verlieren die entstehenden Makropartikel, durch Stöße mit weiteren Gasteilchen, Energie und werden so stabilisiert (engl.: *collisional cooling*) (Loboda und Chernushevich, 2005). *Collisional cooling* in AP-Ionenquellen spielt für die Entstehung von Ionen großer Moleküle (Biomoleküle) eine wichtige Rolle. Die durch diesen Prozess reduzierte innere Energie, die die Ionen während der Ionisierung erhalten haben, senkt die Wahrscheinlichkeit metastabiler Zerfälle (engl.: *post source decay*, PSD; Spengler et al. (1991)) (O'Connor und Costello, 2001).

Bei der explosiven Desintegration einer MALDI Probe entstehen, mit 1000 bis 10000-fachem Überschuss im Vergleich zu ionischen Spezies, Neutralteilchen (Dreisewerd et al., 1995). Neutralteilchen sind nicht elektrostatisch manipulierbar und bedürfen deshalb, zu ihrem Nachweis, besonderer experimenteller, nachionisierender Aufbauten (Spengler et al., 1988; Dreisewerd et al., 1995; Bökelmann et al., 1995). Ein Aspekt unterschiedlich langer Laserpulse ist also auch, inwiefern eine Wechselwirkung des Laserlichts mit der entstehenden Partikelwolke (engl.: *plume*; Neutralteilchen, Ionen, Elektronen) stattfinden kann und ob es z.B. zu unterschiedlich starker Abschirmung der unteren Schichten der Wolke kommt.

Im Hinblick auf die initialen Geschwindigkeit bzw. die initiale Geschwindigkeitsverteilung von Ionen wurden in unterschiedlichen Arbeitsgruppen abweichende Ergebnisse gewonnen. Abhängigkeiten von Substanzklasse, Molekülgröße, Laserwellenlänge, Laserfokusbereich, Präparationsmethode und Matrix werden diskutiert (Juhász et al., 1997; Glückmann und Karas, 1999; Karas et al., 2000; Karas und Krüger, 2003). Offensichtlich besteht sehr wohl ein Einfluss der Molekülgröße und des Laserfokusbereichs auf die initiale Ionengeschwindigkeit (Kinsel et al., 1999; Spengler und Kirsch, 2003). Übereinstimmungen scheinen jedoch grundsätzlich darin zu bestehen, dass die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Moleküle/Ionen unterhalb der Schwellbestrahlungsstärke mit der thermischen Energie korreliert, oberhalb jedoch in Form einer Überschallausbreitung (engl.: *supersonic jet*) mit sehr enger Geschwindigkeitsverteilung stattfindet (Vertes et al., 1989; Amoruso et al., 1999). Dies betrifft sowohl Matrix- als auch Analytionen (Bökelmann et al., 1995). Allerdings konnten Berkenkamp et al. (2002) und Karas et al. (2003) keinerlei signifikanten Effekt der Laserfluenz auf die initiale Ausbreitungsgeschwindigkeit von Matrix- und Analytionen feststellen. Die Ergebnisse wurden mit 2,5-DHB als Matrix erzielt.

Die Ausbreitungsrichtung der *plume* wird vom Winkel des eingestrahlteten Lasers zur Probe beeinflusst. Die Teilchen expandieren in Laserrichtung. Schnelle Matrixionen und neutrale Matrixteilchen im *supersonic jet* (Ausbreitungsgeschwindigkeit bis über 1000 m/s) werden von langsameren Analytionen gefolgt (Ausbreitungsgeschwindigkeit  $\approx 500$  m/s). Jedoch breiten sich auch langsame Matrixmoleküle, sogenannte thermische Matrixmoleküle aus. Innerhalb der geladenen Teilchen, vor allem in der noch dichten Teilchenwolke oberhalb der Probenoberfläche, kommt es zu Schirmungseffekten kurz nach dem Desorptionereignis. Die Dichte der Teilchen und Ionen nimmt dabei winkelabhängig ab und sinkt nach außen hin. Während der Ausbreitung kommt es zu Stößen zwischen unterschiedlich schnellen Analytmolekülen/-ionen und Matrixmolekülen/-ionen,

die die Basis für Austauschprozesse bilden. Mit steigender Laserfluenz nimmt die *plume*-Dichte und damit die Anzahl der Stöße zu (*overlap*-Modell) (Bökelmann et al., 1995).

Insgesamt existieren in Bezug auf die Ausbreitungsgeschwindigkeit sehr große Unterschiede für verschiedene Messsysteme. Elektrostatische Effekte, ungenau bestimmbare Laserparameter und unterschiedliche Präparationswege führen zu eingeschränkter Vergleichbarkeit der Messergebnisse u.U. sogar zu Artefakten. Die Vorstellungen zur Form der Ionen- und Neutralteilchenausbreitung sind dagegen übereinstimmender (insgesamt hierzu Dreisewerd (2003)).

Zur Verbesserung des Prozessverständnisses der bei MALDI ablaufenden Prozesse wurden schon früh Computersimulationen (Modelle) verwendet. Eine der umfangreichsten Computersimulationen jüngerer Zeit hierzu ist das 1997 eingeführte „*breathing sphere*“-Modell (Zhigilei et al., 1997; Zhigilei und Garrison, 1997; Zhigilei et al., 1998; Zhigilei und Garrison, 1998, 2000). Eine Besonderheit des Modells ist der *breathing mode*, der Moleküle mit einer angenommenen Anzahl innerer Freiheitsgrade bei fixer Anzahl translatorischer Freiheitsgrade versieht. Innerhalb der Simulation können sehr viel physikalische und chemische Parameter eingestellt werden. Zudem erlaubt das Modell die Änderung von Moleküleigenschaften während eines Simulationslaufes. Die Ergebnisse der Modellierung zeigen, dass es einen konkreten Übergang von der Desorption (Emission von 1-4 Molekülen von der Probenoberfläche) zur Ablation (zusätzliche Emission von Clustern mit mehr als 10 Molekülen) bei einer bestimmten Schwellbestrahlungsstärke gibt. Unterschiedliche Desorptionsvorgänge (Evaporation, Phasenexplosion) und Energiedissipationswege werden dabei erfasst. In den Simulationen korreliert die initiale Geschwindigkeit der Moleküle mit ihrer Position unterhalb der Probenoberfläche (tiefer liegende Moleküle sind tendenziell langsamer). Die Entstehung von Clustern verlangsamt die axiale Geschwindigkeit, dies wird jedoch partiell durch elastische Stöße der Einzelmoleküle maskiert. Die axiale Ausbreitungsgeschwindigkeit entspricht einer stream-/jet-förmigen Ausbreitung, die radiale einer Maxwell-Boltzmann-Verteilung.

#### 3.4.4.4 Ionenentstehung

Aus den zu beobachtenden Phänomenen, die mit der Partikelemission von der Probenoberfläche und nachfolgender Ausbreitung zusammenhängen, können Rückschlüsse auf die Vorgänge in der Teilchenwolke gezogen werden. Dabei geht es um die Mechanismen, die zu den im Massenspektrum beobachtbaren

Ionen führen. Im Folgenden soll das Augenmerk ausschließlich auf die Entstehung positiver Ionen (Kationen, Radikalkationen, Quasimolekülonen) gerichtet werden.

Die Ergebnisse zu den Grundlagen von MALDI stammen fast ausschließlich aus Untersuchungen mit Time-of-Flight (TOF) Massenanalysatoren aus den 80er und 90er Jahren. Da zusammen mit diesem Analysatortyp Hochvakuumionenquellen benutzt wurden, sind die Vorgänge, gerade in Bezug auf die Bildung von Clustern, nur begrenzt auf Atmosphärendruck (AP)-Ionenquellen übertragbar. Unter Hochvakuumbedingungen verlaufen Prozesse wie z.B. die Desolvation von Molekülen oder Ionen anders als unter Atmosphärendruckbedingungen. Erst in jüngerer Zeit konnten, aufgrund der apparativen Entwicklung, auch Grundlagenexperimente unter AP-Bedingungen durchgeführt werden. Prinzipiell ist die Ionenentstehung abhängig von der Bestrahlungsstärke und unterliegt einer Sättigung (Dreisewerd et al., 1995; Fournier et al., 2003). Dabei werden i.d.R. einfach geladene Ionen erzeugt.

**Präformierte Ionen:** Ausgehend von den Milieubedingungen, die in den Analytlösungen herrschen (sauer/basisch), lagern polare Gruppen entgegengesetzt geladene Ionen an. So werden Carboxylgruppen in ausreichend saurer Lösung neutralisiert, während Amino- oder Amidogruppen eine positive Nettoladung in Form eines Kations erhalten. Geschieht dies bei organischen Makromolekülen entstehen Quasi-Molekülonen. Ladungen können so durch mono- oder multivalente Ionen übertragen werden. Werden die entstandenen Ionen intakt in einen Matrix-Analyt Co-Kristall inkorporiert, so spricht man von präformierten Ionen. Die Aufgabe der Matrix bestünde demnach u.a. in einer Separation präformierter Ionen. Versuche durch Nelson und Hutchins (1992) an Kupfer-Peptid-Komplexen deuten auf die Existenz präformierter Ionen hin. Diese dissoziierten auch nicht während Waschprozeduren. Lehmann et al. (1997) konnten dies für bestimmte Systeme mit Übergangsmetallen und deren Komplexen bestätigen und diesen Sachverhalt auf bekannte thermodynamische Gesetzmäßigkeiten (Komplexstabilität) zurückführen. Jedoch wird hier auf Beobachtungen hingewiesen, die allein durch die Existenz präformierter Ionen nicht erklärbar sind. Des Weiteren konnte die Existenz präformierter Ionen nicht für alle durch Lehmann et al. untersuchten Systeme gezeigt werden. Interessant in diesem Zusammenhang sind Ergebnisse von Horneffer et al. (2006), die zeigen, dass ein Komplex auf der Oberfläche eines Matrixkristalls bestehen bleibt, bei Inkorporation in den Matrixkristall jedoch zerfällt. Experimente mit pH sensitiven Farbstoffen und H-NMR zeigten, dass Analyten den in der

Lösung vorliegenden (de-)protonierten Status im Matrixkristall beibehalten und ein messbarer Anteil Lösungsmittel im Kristall verbleibt. Dies deutet auf eine Solvatisierung des Analyten im Kristall hin. Der Restanteil an Lösungsmittel verschwindet teilweise durch Trocknung (Krüger et al., 2001). Pshenichnyuk und Asfandiarov (2004) beschreiben zusätzlich die Diffusion freier Elektronen aus einem evtl. verwendeten metallischen Probensubstrat in die Analytlösung. Dies bedeutet also eine negative Nettoladung der Analytlösung. Während der Trocknung und Bildung des Matrixkristalls wird ein Verbleib der Elektronen (*pre-formed/pre-present electrons*) in solvatisiertem Zustand, gebunden an benachbarte Moleküle, im Kristall vermutet.

**Cluster Ionisation:** Was passiert jedoch nach Desorption/Ablation der Moleküle und Ionen aus dem Festkörper durch den Laser? Der Cluster-Ionisations-Mechanismus versucht hierfür Erklärungsansätze zu liefern, vor allem im Hinblick auf die Beobachtung, dass bei MALDI (nahezu) ausschließlich einfach geladene Quasimolekül-Ionen auftreten (Karas et al., 2000; Karas und Krüger, 2003). Direkte Hinweise auf die Rolle von Clustern konnten für die Matrices 2,5-DHB und  $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure, durch Experimente, die ausschließlich große, hochgeladene Partikel nachweisen, erhalten werden (Fournier et al., 2002, 2005). Der Mechanismus geht von der Existenz präformierter Ionen im Festkörper aus, zieht jedoch auch die Existenz von freien Elektronen und Wasserstoff/Wasserstoffradikalen (Scott et al., 1994), in der MALDI-*plume*, in Betracht. Die freien Elektronen entstehen durch Photoionisation von Matrixmolekülen (Spengler et al., 1987; Ehring et al., 1992; Karas et al., 2000; Knochenmuss, 2004) oder können aus dem Probensubstrat stammen (metallischer Probenträger) (Frankevich et al., 2002, 2003; Knochenmuss, 2004). Rekombinationen mit freien Elektronen, Wasserstoffradikalen und Wasserstoffionen sind möglich und energetisch favorisiert und führen schließlich zu einfach geladenen Ionen (Karas et al., 2000). Freie Elektronen können natürlich auch mit erzeugten positiven Ionen rekombinieren und diese somit unterdrücken (Dash-tiev et al., 2006; McCombie und Knochenmuss, 2006). Wichtiger Ansatzpunkt des Cluster-Ionisations-Mechanismus ist der Übergang vom Festkörper in die Gasphase. Der Übergang findet hauptsächlich in Form von Clustern statt (Loboda und Chernushevich, 2005). Diese bestehen aus Analytmolekülen/-ionen, Matrixmolekülen/-ionen und u.U. Verunreinigungen. Die Cluster sind energetisch angeregt und sollten in der Lage sein, effektiv zu desolvatisieren, also überschüssige Teilchen zu verlieren. Dabei werden unterschiedliche Teilchenspezies verloren, was u.a. mit einem Ladungsverlust einhergeht. Übrig bleibt

schließlich eine „effektive“ Ladung (Karas et al., 2000).

Die direkte Photoionisation einzelner Matrixmoleküle ist relativ unwahrscheinlich. Experimentelle Bestimmung der notwendigen Ionisierungsenergie von 2,5-DHB ergaben einen Wert von 8,05 eV. Dies wird nicht durch zwei Photonen bei 337 nm erreicht, da diese in der Summe nur 7,36 eV liefern (Karch und Knochenmuss, 1998). Bei der Wellenlänge eines N<sub>2</sub>-Lasers wäre die direkte Photoionisation eines Matrixmoleküls demnach nur durch einen mindestens Dreiphotonen-Prozess möglich.

Im Zusammenhang mit Energiesammelprozessen in Clustern erscheint eine Ionisation auf diesem Wege als wahrscheinlicher (Ehring et al., 1992; Jaskolla und Karas, 2008). Der Cluster-Ionisations-Mechanismus wird zusätzlich durch Modellsimulationen der Arbeitsgruppe Zhigilei gestützt, die die Entstehung von Clustern auf der Basis postulierter Mechanismen zeigen (Zhigilei et al., 1998; Zhigilei und Garrison, 2000).

**two-step-Mechanismus/*in-plume*-Prozesse:** Ein anderer Ansatz beschäftigt sich vor allem mit den Vorgängen simultan zum Laserpuls und in der danach entstehenden MALDI-*plume*. Dabei werden angeregte bzw. ionisierte Matrixmoleküle als hauptsächliches Agens für die Bildung von Analytationen angesehen. Hierfür wurde ein *two-step*-Mechanismus vorgeschlagen, der die Ionisationsmechanismen des MALDI Prozesses unterscheidet in: 1) die Teilchen-/Ionenspezies, die mit Beginn des Laserpulses in der Probe entstehen/vorhanden sind und 2) die, die durch Sekundärprozesse in der Teilchen-/Ionenwolke gebildet werden (Bökelmann et al., 1995; Knochenmuss und Zenobi, 2003; Knochenmuss, 2006). Die Dichte der MALDI-*plume* liegt zu Beginn, also kurz nach der Desorption direkt oberhalb der Probe im Bereich von 1/10 des Festkörpers ( $\approx$  Atmosphärendruck) (Knochenmuss et al., 2000). Damit ist die Möglichkeit zahlreicher Molekül-/Ionenkollisionen gegeben. Die bereits beschriebene heterogene Ausbreitung von Analytationen und Matrixmolekülen/-ionen bietet auch bei expandierender MALDI-*plume* die Möglichkeit weiterer Kollisionen und damit zu *in-plume*-Prozessen. Als ionische Matrixspezies werden  $[M]^{\bullet+}$ ,  $[M+H]^+$ ,  $[M-H]^+$ ,  $[M+2H]^{\bullet+}$ ,  $[M-H]^-$ ,  $[M-2H]^{\bullet-}$  und  $[M]^{\bullet-}$  beschrieben (Ehring et al., 1992). Ehring et al. schlug 1992 einen thermoionischen Mechanismus vor: ein Matrixmolekül wird durch Absorption von zwei Photonen angeregt und schließlich, durch einen Restbetrag an thermischer Energie, ionisiert. Auch Allwood et al. (1997) vermutet einen solchen Mechanismus zur Matrix-Ionisierung. Karch und Knochenmuss (1998) bestätigte durch Berechnungen, dass zur Photoionisation der Matrixmoleküle zwei Photonen der Wellenlänge  $\lambda = 337$  nm nicht aus-



reichen. Bei der Ionisation der Matrix kommt es hauptsächlich zur Entstehung von  $[M]^{\bullet+}$ -Ionen. Untersuchungen von Grigoren et al. (1996) zeigen, dass diese primär für die Ionisation der Analytmoleküle verantwortlich sind. Die kovalente Modifikation der funktionellen Gruppen einiger Matrices ( $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure und Sinapinsäure), führte dennoch zur Bildung von  $[A+H]^+$ -Ionen. Eine photochemische Ionisierung von Matrixmolekülen ( $2(M + h^*\nu) \rightarrow [M]^{\bullet+} + M \rightarrow [M+H]^+ + [M-H]^{\bullet}$ ) könnte somit zum protonierenden Agens für neutrale Analytmoleküle, zum  $[A+H]^+$ -Ion, führen. Deshalb entstehen hauptsächlich Quasimolekülionen des Analyten. Das Potential von  $[M]^{\bullet+}$ -Ionen reicht zur direkten Ionisierung von Analytmolekülen nicht aus.

Für 2,5-DHB als Matrix wird durch Karbach und Knochenmuss (1998) ein Decarboxylierungsmechanismus diskutiert, der über Hydrochinon als protonierendes Agens verlaufen soll.

Durch Liao und Allison (1995) wurden weitere mechanistische Ansätze vorgestellt. Dabei kommt zusätzlich, zum bereits genannten, die Bildung von  $[A+H]^+$ -Ionen (Analyt = A) aus einem  $[A]^{\bullet+}$ -Kationenradikal hinzu. Dieses  $[A]^{\bullet+}$ -Kationenradikal wird selbst über die Anregung durch mehrere angeregte Matrixmoleküle gebildet. Bei den Mechanismen sind chemische Eigenschaften des Analyten (Protonenaffinität, Wasserstoffaffinität) wichtig und eine evtl. Senkung des  $pK_A$  Wertes der angeregten Matrix wird diskutiert. Interessant ist die Beobachtung, dass die Menge an  $[M]^{\bullet+}$ -Ionen mit steigender Laserfluenz zunimmt, während die Menge an  $[M+H]^+$ -Ionen sinkt. Dies wird als Indiz gedeutet, dass es sich bei der Ionisation der Matrix doch um einen Multiphotonenprozess handelt.

Die Kationisierung von Analytmolekülen, z.B. durch Alkaliionen, ist ein häufig beobachtetes Phänomen. Dabei scheinen unterschiedliche Matrices eine stärkere oder schwächere Tendenz zur Kationisierung beim Analyten zu bewirken. Dies scheint mit dem Alkaliionengehalt der Matrix zu korrelieren (Zhang und Zenobi, 2004). Experimente von Liao und Allison (1995), in denen u.a. Hochsalz-Bedingungen hergestellt wurden, zeigen, dass bei Sinapinsäure als Matrix keine Alkaliadduktionen des Analyten entstehen, bei  $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure sowohl protonierte Analytionen als auch Alkaliadduktionen und bei 2,5-DHB ausschließlich Alkaliadduktionen festzustellen sind (allerdings wurden Sinapinsäure und  $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure in 2/3 Wasser + 1/3 Acetonitril gelöst).

***energy pooling/energy hopping/exciton mobility:*** Neuere Untersuchungen mittels *fluorescent traps* (Energiefallenmoleküle, engl.: *quencher*) er-

gaben interessante Erkenntnisse zur Rolle der Matrix. Zum einen konnte gezeigt werden, dass Energie über bestimmte Distanzen in der Matrix transportiert wird, so dass *energy pooling* (Energiesammlung über mehrere angeregte Matrixmoleküle in einem einzigen; Donovan, 1979) in der Matrix plausibel erscheint. Zum anderen konnten Rückschlüsse auf thermische Transportprozesse in der Matrix gezogen werden. Der Energietransport durch Konversionsprozesse (*energy hopping/exciton mobility*) scheint dabei bedeutend schneller zu sein als thermische Äquilibration (Setz und Knochenmuss, 2005; Jaskolla und Karas, 2008).

Die bisher dargestellten Ergebnisse und Modelle beziehen sich größtenteils auf Untersuchungen von Peptiden. Es bestehen jedoch Unterschiede zu den Ionisationsmechanismen weiterer Substanzklasse. Glückmann und Karas (1999) konnte Unterschiede bei der Ionenentstehung zwischen Sacchariden und Peptiden feststellen: während Saccharide nicht unbedingt in Matrix inkorporiert sein müssen (im Sinne von Co-Kristallisation), sich aber im Innern eines Kristalls befinden, müssen Peptide, ab einer bestimmten Molekülgröße, in die Matrix inkorporiert sein. Saccharide zeigen zudem eine deutlich niedrigere Initialgeschwindigkeit als Peptide. Mischt man Saccharide zu peptidischen MALDI Präparationen als Additiv hinzu, resultiert dies in verringerter metastabiler Fragmentierung der Peptide und somit zu verlängerten Messzeiten. Bei FT Messungen wird so eine genauere Massenbestimmung möglich (Castoro und Wilkins, 1993). Dies wurde schon von Beavis et al. (1988) beobachtet.

### 3.4.5 Massenanalysatoren in der Massenspektrometrie

Die Mechanismen, die zur Erzeugung von Ionen innerhalb der Ionenquelle des Massenspektrometers postuliert werden, wurden bereits dargestellt. Der nun folgende Schritt, die Analyse der erzeugten Ionen in Abhängigkeit von ihrem Masse-zu-Ladung Verhältnis ( $m/z$ ), kann durch unterschiedliche Typen von Massenanalysatoren erfolgen. Die Massenanalysatoren verwenden verschiedene Prinzipien zur Analyse der erzeugten Ionen (elektrostatische oder elektromagnetische Felder). Dies ermöglicht die Bewegung der erzeugten Ionen zu beeinflussen und so Gesetzmäßigkeiten darüber zu formulieren und anzuwenden. Im Folgenden soll nicht allgemein auf die Funktionsweise von Massenanalysatoren eingegangen werden, sondern lediglich auf die, die für die Analysen innerhalb dieser Arbeit verwendet wurden. Hierzu zählen der lineare Ionenfallen- und der Fourier-Transform-Ionen-Cyclotron-Resonanz-(FT-ICR) Massenanalysator.

### 3.4.5.1 Funktionsweise eines Ionenfallenmassenanalysators

Von Ionenfallenmassenanalysatoren existieren zwei unterschiedliche Typen, die 3-D-Quadrupolionenfalle und die lineare Quadrupolionenfalle. Beide gehen auf die Arbeiten von Wolfgang Paul und Helmut Steinwedel zurück (Paul und Steinwedel, 1953). Da die lineare Ionenfalle für die Anfertigung dieser Arbeit verwendet wurde, soll diese im Folgenden näher beschrieben werden. Die lineare Quadrupolionenfalle besteht aus vier hyperbolisch geformten Stäben (Elektroden), die parallel zueinander angeordnet sind und deren Stirnseiten in einem Rechteck zueinander stehen. Die Größe/der Innenraum der Ionenfalle wird durch die Innenseiten der Stäbe, in x- und y-Richtung, begrenzt. In z-Richtung entspricht dies etwa der Länge der Stäbe. Die Symmetrie des erzeugten Quadrupolfeldes ergibt sich aus Gleichung 3.7 (Paul, 1990),

$$\Phi \sim r^{\frac{n}{2}} \cos\left(\frac{n}{2}\varphi\right) \quad (3.7)$$

$\Phi$  = Symmetrieordnung,  $n$  = Anzahl der Multipole

wobei  $n$  die Anzahl der Multipole ist (2 n-Multipole;  $n = 2$  beim Quadrupol) (Szabo, 1986).

Elektrisch isoliert befinden sich jeweils an den Enden der Stäbe (engl.: *front section*, *back section*) zwei weitere Elektroden, die zur Speicherung (engl.: *trapping*) von Ionen im Innenraum der vier Stäbe benötigt werden. Sie werden deshalb als *trapping*-Elektroden bezeichnet (siehe Abb.3.6 A, S.42). Das elektrische Potential der *trapping*-Elektroden kann so verändert werden, dass Ionen in die Ionenfalle gelangen können, durch anschließende Potentialveränderung aber auch in der Ionenfalle gehalten werden (*front section*: -9 V Ioneninjektion, 20 V Ionenanalyse; *back section*: -12 V Ioneninjektion, 20 V Ionenanalyse). Die vier mittleren Stäbe der Ionenfalle sind jeweils über Kreuz miteinander verschaltet. Sie stehen im Abstand  $2 r_0$  auseinander. Es liegt jeweils eine Gleichspannung ( $U$ ) und eine überlagerte Wechselspannung ( $V$ ) mit der Frequenz  $\omega$  an den Stäben an, wobei die Spannungen an den gegenüberliegenden Elektroden jeweils das selbe Vorzeichen aufweisen. Eine typische Frequenz der Wechselspannung liegt bei 1 MHz (Douglas, 2009). Daraus ergibt sich eine Gesamtspannung  $\Phi_0$ , deren Betrag durch Gleichung 3.8 beschrieben wird.

$$\Phi_0 = U + V \cos \omega t \quad (3.8)$$

$\Phi_0$  = Gesamtpotential,  $U$  = Gleichspannung,

$V$  = Wechselspannung,  $\omega$  = Frequenz der Wechselspannung  
 $t$  = Zeit

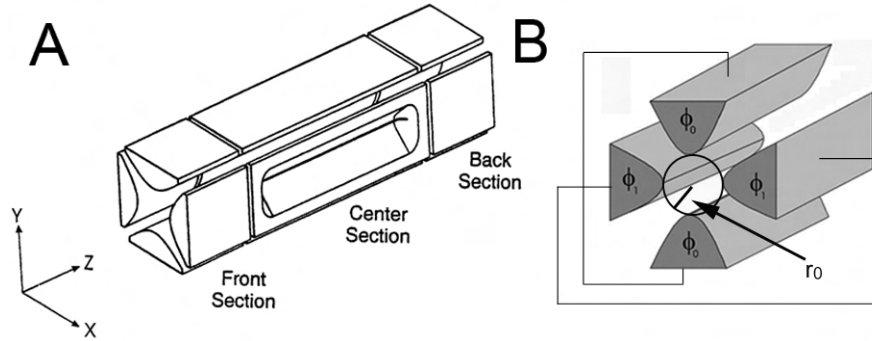


Abbildung 3.6: Lineare Quadrupolionenfalle

Aufbau einer linearen Quadrupolionenfalle (A) und Schaltbild der inneren, hyperbolischen Stäbe (B). (A) Die Dimensionen der linearen Ionenfalle werden über ein Cartesisches Koordinatensystem mit x-, y- und z-Achse beschrieben. Die Ionenfalle weist drei Segmente auf: die Front-Sektion (*front section*), die mittlere Sektion (*center section*) und die hintere Sektion (*back section*). Alle Segmente sind elektrisch voneinander isoliert. Abbildung (B) zeigt die elektrische Verschaltung der Stäbe der mittleren Sektion. Diese sind jeweils über Kreuz miteinander verschaltet (Gesamtspannung:  $\Phi_1 = -\Phi_0$ ).  $r_0$  = halber Abstand der hyperbolischen Stäbe. ((A) aus Thermo Electron Corporation, 2003; (B) modifiziert nach [www.physik.tu-cottbus.de](http://www.physik.tu-cottbus.de))

Die Feldstärke ( $E$ ), die sich aus der angelegten Spannung ergibt, wird durch Gleichung 3.9 bis 3.11 beschrieben. Hier steht  $r_0$  angenähert für halben Abstand zwischen den inneren Oberflächen der hyperbolischen Stäbe.

$$E_x = -\frac{\Phi_0}{r_0^2} x \quad (3.9)$$

$$E_y = \frac{\Phi_0}{r_0^2} y \quad (3.10)$$

$$E_z = 0 \quad (3.11)$$

$E_{x,y,z}$  = Feldstärke in x,y,z-Richtung,  
 $r_0$  = halber Abstand zwischen den Innenseiten  
der hyperbolischen Stäbe

Die Ionenbewegung, die sich aus der angelegten Feldstärke und der angelegten Spannung ergibt, wird durch die Gleichungen 3.12 und 3.13 beschrieben. Dieser Typ der Differentialgleichung wird als Mathieu-Gleichung bezeichnet.

$$\ddot{x} + \frac{e}{m r_0^2} (U + V \cos \omega t) x = 0 \quad (3.12)$$

$$\ddot{y} + \frac{e}{m r_0^2} (U + V \cos \omega t) y = 0 \quad (3.13)$$

$\ddot{x}, \ddot{y}$  = zweite zeitliche Ableitung von x und y, e = Elementarladung,

$r_0$  = halber Abstand zwischen den Innenseiten

der hyperbolischen Stäbe, U = Gleichspannung,

V = Wechselspannung,  $\omega$  = Frequenz der Wechselspannung,

t = Zeit, m = Masse

Die Funktionen können auch unter Verwendung dimensionsloser Parameter (a, q) geschrieben werden (Gl. 3.14 und 3.15). Die Größen a und q werden auch als Mathieu-Parameter bezeichnet.

$$\frac{d^2 x}{d\tau^2} + (a + 2q \cos 2\tau) x = 0 \quad (3.14)$$

$$\frac{d^2 y}{d\tau^2} + (a + 2q \cos 2\tau) y = 0 \quad (3.15)$$

Durch Vergleich mit den Bewegungsgleichungen 3.12 und 3.13 ergeben sich die Gleichungen 3.16 bis 3.18 in denen die Parameter a, q und  $\tau$  isoliert auftreten.

$$a = \frac{8 e U}{m r_0^2 \omega^2} \quad (3.16)$$

$$q = \frac{4 e V}{m r_0^2 \omega^2} \quad (3.17)$$

$$\tau = \frac{\omega t}{2} \quad (3.18)$$

a, q,  $\tau$  = Mathieu-Parameter, e = Elementarladung,

$r_0$  = halber Abstand zwischen den Innenseiten

der hyperbolischen Stäbe, U = Gleichspannung,

V = Wechselspannung,  $\omega$  = Frequenz der Wechselspannung,

t = Zeit, m = Masse

Ob die Bewegung eines Ions im Quadrupolfeld stabil oder instabil ist, hängt ausschließlich von den Parametern a und q ab. Um die Ionen auf stabilen Bahnen zu halten, bewegen sich die Parameter a und q zwischen  $0 < a, q < 1$  (Paul, 1990; Douglas, 2009). Hierbei verhalten sich U und V, sowie a und q wie folgt:

$$\frac{a}{q} = \frac{2U}{V} = konst. \quad (3.19)$$

$a, q$  = Mathieu-Parameter,  $U$  = Gleichspannung,  
 $V$  = Wechselspannung

Setzt man  $a = 0$  ( $\hat{=}$  Gleichspannung = 0), erreicht man einen sogenannten Breitbandfilter. Der Stabilitätsbereich wird maximal und der Quadrupol lässt unselektiert alle Ionen innerhalb des Stabilitätsbereiches passieren (*high-pass mass filter, rf-only mode*). Die Stabilitätsbereiche der Ionenbewegung in x- und y-Richtung werden durch Abbildung 3.7 (S.45) beschrieben. Aus den Gleichungen 3.14 und 3.15 ergeben sich unendlich viele Stabilitätsbereiche für Bewegungen in x- oder y-Richtung, aber nur die Lösungen, die die Bedingung  $a_y = -a_x$  und  $q_y = -q_x$  erfüllen, ergeben eine stabile Bewegung sowohl in x- als auch in y-Richtung (Douglas et al., 2005; Douglas, 2009). Aus diesen Stabilitätsbereichen, in denen die Ionen sowohl in x- als auch in y-Richtung stabil sind, wird von Quadrupol Massenspektrometern bzw. Ionenfallen häufig ein bestimmter Bereich genutzt (Bereich I in Abbildung 3.7 A, S.45). Der Parameter  $a$  bewegt sich hier im Bereich von 0-0,23699 und der Parameter  $q$  von 0-0,908. Die Wertebereich für  $a$  und  $q$  wird durch Abbildung 3.7 B vergrößert dargestellt. Die Werte sind ausschließlich in den positiven Achsenabschnitten, da diese in der Praxis Verwendung finden. Mathematisch erstreckt sich dieser Stabilitätsbereich jedoch von  $a$  bis  $-a$  symmetrisch zur  $q$ -Achse (näheres siehe Drakoudis et al. (2006)).

Zur Analyse von Ionen mittels einer Ionenfalle, müssen diese zunächst hinein gelangen und dort gespeichert werden. Dazu werden die elektrostatischen Potentiale der vorderen und hinteren Sektion gesenkt. In der Ionenfalle befindet sich ein Dämpfungsgas (Helium, He;  $1 \cdot 10^{-3}$  mbar; Thermo Electron Corporation (2003)), das die axiale und laterale Bewegung der in die Falle gelangenden Ionen stark dämpft (March, 2009). Durch die Dämpfung der Ionenbewegung werden lange Öffnungszeiten (*injection time, IT*) der Ionenfalle möglich. Ziel ist die Speicherung einer möglichst großen Ionenzahl. Nachdem die Ionen in die Ionenfalle gelangt sind, werden die Gleichspannungspotentiale der vorderen und hinteren Sektion auf den Wert für die Massenanalyse verändert. Das Gleichspannungspotential der mittleren Sektion bleibt gleich. Die Ionenfalle operiert bei einer gleich bleibenden Wechselspannungsfrequenz der Haupt-Radiofrequenz (engl.: *main RF voltage*) von 1,2 MHz. Die Amplitude kann dabei von 0 bis 10000V verändert werden. Um eine möglichst große Bandbreite an Ionen oberhalb eines gewissen  $m/z$ -Verhältnisses auf stabilen Bahnen zu halten, ist die

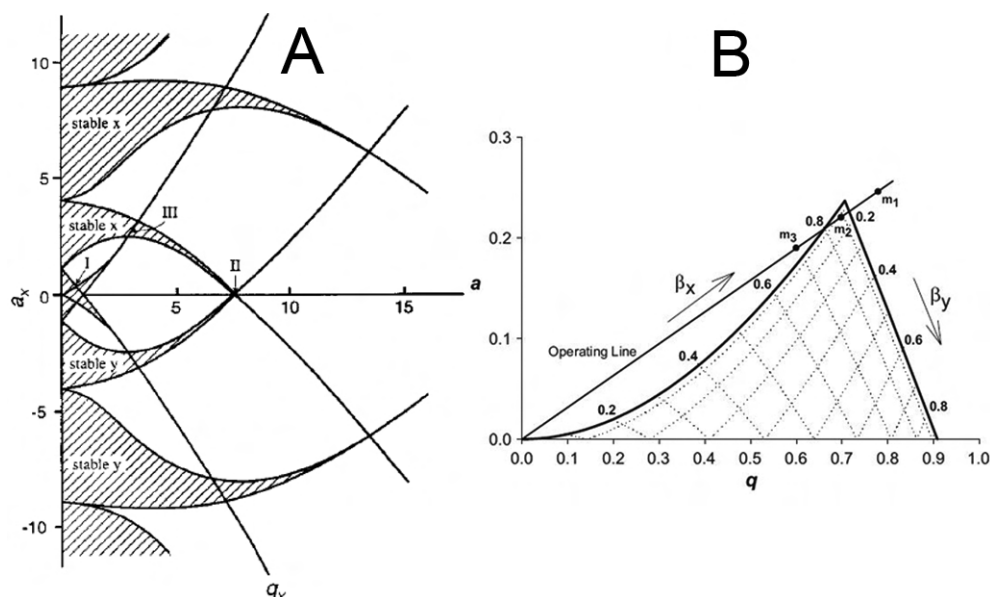


Abbildung 3.7: Ionen-Stabilitätsbereiche im linearen Quadrupol

Stabilitätsbereiche der Ionenbewegung, die sich aus den Bewegungsgleichungen (Gl.3.14 und 3.15) für einen linearen Quadrupol, in x- und y-Richtung (I, II, III) ergeben. Quadrupol- und Ionenfallen-Massenspektrometer operieren meist im Stabilitätsbereich I (A). Abbildung B zeigt den Stabilitätsbereich I in Vergrößerung dargestellt. Stabile Ionenbewegungen erhält man in den Grenzen:  $a$ : 0-0,23699;  $q$ : 0-0,908 (Douglas, 2009).

Amplitude der Haupt-Radiofrequenz zunächst gering (engl.: *storage voltage*). Zur Massenanalyse müssen die Ionen, die sich innerhalb der Ionenfalle befinden, ihren Stabilitätsbereich verlassen. Die Ionen werden dazu, durch resonante Anregung, aus dem Stabilitätsbereich „vertrieben“. Um eine Massenuntersuchung durchzuführen wird die Amplitude der Haupt-Radiofrequenz sukzessive erhöht. Durch zwei, der insgesamt vier hyperbolischen Stäbe, die teilweise längs geschlitzt sind, können die Ionen die Ionenfalle verlassen. Dies wird als radiale Ejektion bezeichnet (siehe Abbildung 3.6, S.42, Schlitzdimensionen LTQ:  $0,25 \times 30 \text{ mm}$ ). Ionen, die aufgrund ihres  $m/z$ -Verhältnisses zu einer bestimmten RF-Frequenz resonant sind, werden beim Erreichen der Resonanzfrequenz (engl.: *resonance voltage*) ejeziert und anschließend detektiert. Zusätzlich zur Haupt-Radiofrequenz werden weitere Wechselspannungen mit charakteristischer Frequenz, Amplitude und Phase angelegt. Diese werden ausschließlich auf den geschlitzten hyperbolischen Stäben angelegt. Es handelt sich um die Resonanz-Ejektions-RF-Spannung (engl.: *resonance ejection RF voltage*), die Isolations-Wellenprofil-Spannung (engl.: *isolation waveform voltage*) und die Resonanz-Anregungs-RF-Spannung (engl.: *resonance excitation RF voltage*).

Die drei Spannungen sind identisch in ihrer Amplitude, werden jedoch um  $180^\circ$  phasenverschoben verwendet (Thermo Electron Corporation, 2003). Die Resonanz-Ejektions-RF-Spannung dient zusätzlich zum Auswerfen der Ionen aus der Ionenfalle. Sie wird bei gleichbleibender Frequenz, jedoch mit parallel zur Haupt-Radiofrequenz steigender Amplitude angewendet. Die Ionen eines bestimmten  $m/z$ -Verhältnisses werden so stärker beschleunigt und es kommt zu schnellerer radialer Ejektion. Die Folge ist eine verbesserte Massenauflösung. Zur Isolation eines bestimmten  $m/z$ -Verhältnisses, für ein anschließendes  $MS^2$  Experiment, wird die Isolations-Wellenprofil-Spannung, verwendet. Sie besteht aus einer Frequenzverteilung zwischen 5-500 kHz. Ist eine Ionenpopulation eines bestimmten  $m/z$  Verhältnisses isoliert worden, wird sie im folgenden  $MS^2$  Experiment, durch die Resonanz-Anregungs-RF Spannung, kinetisch angeregt. Die Fragmentierung erfolgt nicht nur durch den Zugewinn an kinetischer Energie, sondern zusätzlich durch vermehrte Kollisionen mit Heliumatomen.

#### 3.4.5.2 Funktionsweise eines Fourier-Transform

##### Ionen-Cyclotron-Resonanz (FT-ICR) Massenanalysators

Neben der oben beschriebenen elektrostatischen Ionenfalle existieren auch solche, die Ionen mittels eines starken, permanenten Magnetfeldes halten. Dieser Fallentyp wird auch als Penning-Falle bezeichnet. Benannt wurde die Falle nach dem niederländischen Physiker F. M. Penning durch H. G. Dehmelt, der angeregt durch Penning 1959 die erste Ionenfalle dieses Typs baute. Gedanklich geht das verwendete Prinzip sogar auf das Jahr 1932 zurück, in dem Lawrence und Livingston erste Experimente mit ähnlichem Aufbau durchführten. Innerhalb des *Finnigan* LTQ-FT Massenspektrometers wird im FT-ICR Massenanalysator eine ICR-Falle verwendet, die ein ähnliches Bauprinzip aufweist.

Das erste FT-ICR Massenspektrometer wurde 1974 durch Comisarow und Marshall (1974) entwickelt. Zentraler Bestandteil dieses Gerätes ist ein starker (supraleitender) Magnet. Die Feldstärke heutiger supraleitender Magnete, verwendet in kommerziell erhältlichen FT-ICR MS, liegen zwischen 4 und 12 Tesla.

Die geometrische Form der ICR-Ionenfallen ist kubisch oder zylindrisch. Ein detaillierter Überblick hierüber wird in Guan und Marshall (1995) und Marshall et al. (1998) gegeben. Ähnlich der Paul-Falle weisen auch Fallen des ICR-Typs Elektroden auf, die den Innenraum der Falle axial und radial begrenzen. Auch hier dienen die axialen Elektroden dem Einfangen (engl.: *trapping*) der in der Falle befindlichen Ionen, indem sie ein quadrupolares elektrostatisches Potential schaffen. Hierzu werden bestimmte Gleichspannungen angelegt. Die



radialen Elektroden sind über Kreuz verschaltet und haben zweierlei Aufgaben: zum einen die resonanten Anregung, der in der Falle befindlichen Ionen (jeweils paarweise durch die Verschaltung), zum anderen der Detektion, des durch die angeregten Ionen erzeugten Induktionsstromes. Eine schematische Darstellung bietet Abbildung 3.8 (S.48). Die Magnetfeldlinien verlaufen axial durch die ICR-Zelle. Gelangen Ionen in die Ionenfalle, so werden sie durch das statische, homogene Magnetfeld und die angelegten elektrostatischen Felder der axialen Elektroden am Verlassen der ICR-Zelle gehindert (Thermo Electron Corporation, 2004).

Die Position der Ionen unmittelbar nach dem Eintritt in die ICR-Zelle ist zufällig. Ihre Bewegung ist jedoch auf einen kleinen Raum begrenzt (Bewegung  $\ll$  Ausmaß der Falle). Ihre innere Energie und damit ihre Bewegungsenergie entspricht der thermischer Ionen. Die Größe ihres Bewegungsradius wird hierbei u.a. durch die Stärke des bestehenden Magnetfeldes ( $B$ ) bestimmt. Je stärker das Magnetfeld ist, desto kleiner ist der Bewegungsradius. Vergleicht man die Bewegungsradien unterschiedlich großer Ionen miteinander, so steigen die Radien mit dem  $m/z$ -Verhältnis. Diese „Ruhebewegung“ der Ionen wird jedoch nicht massenanalytisch genutzt, da sie zufällig erfolgt. Ähnlich der resonanten Absorption der Ionen in einer Paul-Falle absorbieren auch Ionen, die sich in einer ICR-Falle befinden, in Abhängigkeit von der Stärke des angelegten Magnetfeldes, auf charakteristische Weise resonante Wellen im Radiofrequenzbereich. Hierdurch wird eine spezifische Bewegung der Ionen induziert, die sogenannte Ionen Cyclotron Bewegung. Sie kann massenanalytisch genutzt werden. Die Abhängigkeit der Bewegung von  $B$  = Magnetfeld,  $m$  = Masse des Ions,  $q$  = Ladung des Ions zeigen die Gleichungen 3.20 und 3.21.

$$\omega_c = \frac{q B_0}{m} \quad (3.20)$$

$$\nu_c = \frac{\omega_c}{2\pi} \quad (3.21)$$

$\omega_c$  = Winkelgeschwindigkeit (Cyclotronfrequenz),  $q$  = Ladung des Ions,

$B$  = Magnetfeldstärke,  $m$  = Masse,

$\nu_c$  = Cyclotron-Frequenz

Die kreisförmige Cyclotron Bewegung wird durch die beim senkrechten Schneiden der Magnetfeldlinien verursachte Lorentz-Kraft bewirkt („Rechte-Hand-Regel“). Die Frequenz  $\nu_c$  wird als Cyclotron-Frequenz bezeichnet. Ionen können somit spezifisch über die ihnen eigene Cyclotron-Frequenz angeregt werden. Effekt dieser Anregung ist eine Vergrößerung des Bewegungsradius innerhalb der

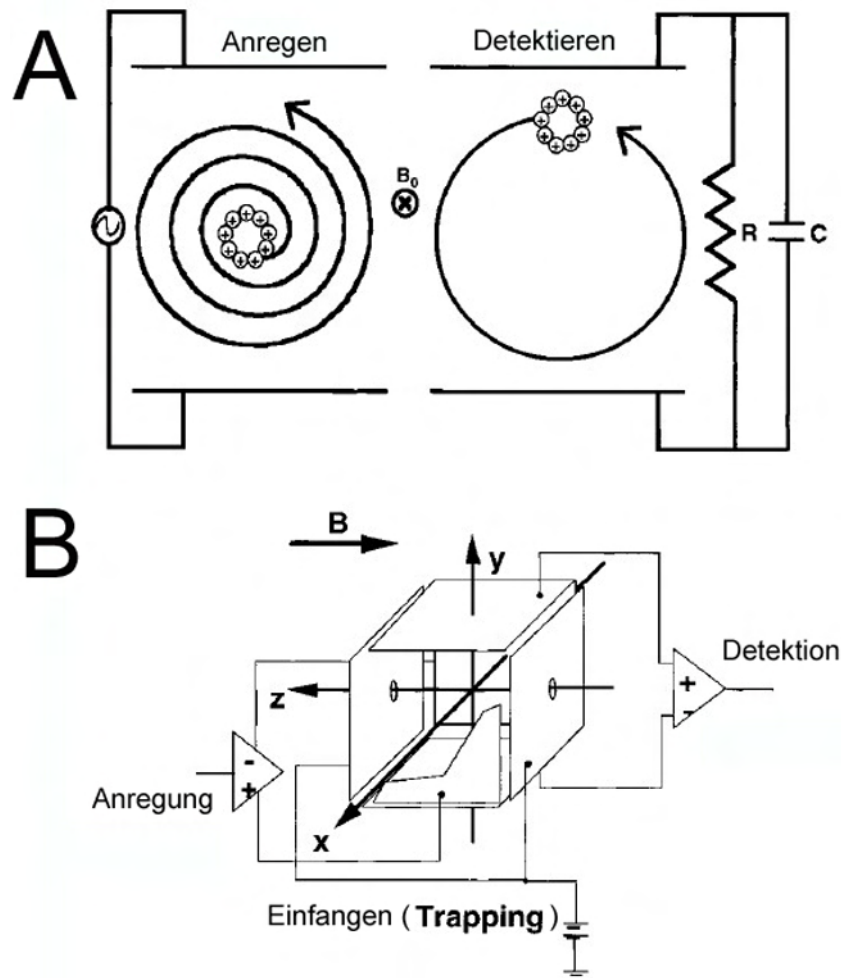


Abbildung 3.8: ICR Messprinzip, Kubische ICR-Zelle

Darstellung des Messprinzips eines FT-ICR MS und des Aufbaus einer kubischen ICR-Zelle. (A) Resonante Anregung in einer ICR-Zelle befindlicher Ionen (Vergrößerung des Radius der Ionenbewegung). Die Kreisfrequenz der Ionen hängt von ihrem  $m/z$ -Verhältnis ab. Detektion der konzentriert auf Kreisbahnen befindlichen Ionen. (B) Schematischer Aufbau einer kubischen ICR-Zelle. Die Richtung des permanenten Magnetfeldes ( $B \rightarrow$ ) ist angegeben. Die Zelle besitzt sechs Elektroden: zwei in  $z$ -Richtung (links und rechts, *trapping*-Elektroden), zwei in  $x$ -Richtung (vorn und hinten, Anregungselektroden) und zwei in  $y$ -Richtung (oberhalb und unterhalb, Detektionselektroden). Die Ionen werden in  $z$ -Richtung in die ICR-Zelle eingelassen (modifiziert nach Marshall et al. (1998)).

ICR-Zelle. Diese Anregung wird durch die in Abbildung 3.8 B (S.48) beschriebenen Anregungselektroden erzielt. Das Anregungspotential ist relativ klein (wenige Volt). Wichtig hierbei ist, dass alle resonanten Ionen gleichen  $m/z$ -Verhältnisses die gleiche Cyclotron-Frequenz unabhängig von ihrer Anfangsge-

schwindigkeit aufweisen. Dies wird durch Gleichung 3.22 beschrieben, wobei  $k$  für die Boltzmann-Konstante und  $T$  für die thermodynamische Temperatur steht.

$$r = \frac{1}{q B_0} \sqrt{2 m k T} \quad (3.22)$$

$r$  = Radius der Kreisbahn der Ionen,  $q$  = Ladung des Ions,

$B$  = Magnetfeldstärke,  $m$  = Masse

$k$  = Boltzmann-Konstante,  $T$  = thermodynamische Temperatur

Durch die Anregung werden zwei Dinge erreicht bzw. können bei geeigneter Amplitude der Anregung erreicht werden:

1. Die resonante Anregung der Ionen gleichen  $m/z$ -Verhältnisses führt zu einer räumlichen Kohärenz derselben (gleicher Bewegungsradius, gleiche Position auf der Kreisbahn; siehe Abb.3.8 A, rechts; S.48).
2. Regt man Ionen unterschiedlichen  $m/z$ -Verhältnisses entsprechend an, so erzielt man den gleichen Bewegungsradius bei unterschiedlichen Ionenspezies. Ionen unterschiedlichen  $m/z$ -Verhältnisses können so simultan bei gleicher Empfindlichkeit detektiert werden, da sie sich im gleichen Abstand zu den Detektorelektroden befinden (Marshall et al., 1998).

Die angeregten Ionen induzieren gemäß ihrer Cyclotron-Frequenz einen Strom in die Detektorplatten der ICR-Zelle. Dabei ist die Stärke des induzierten Stroms unabhängig von der Masse der Ionen, sondern hängt allein von deren Radius (Abstand zu den Detektorplatten) und Anzahl ab (Comisarow, 1985). Dies entspricht dem Idealfall einer ungestörten Cyclotron-Bewegung. Im Realfall besitzt das angelegte quadrupolare *trapping*-Potential neben der axialen auch eine radiale Komponente. Dies führt dazu, dass die in der ICR-Zelle befindlichen Ionen zusätzlich zur Cyclotron-Bewegung noch die Magnetron-Bewegung und die axiale Oszillation (*trapping oscillation*) zeigen (siehe Abb.3.9, S.50).

Daraus ergeben sich nun drei neue Gleichungen die diese Bewegungen beschreiben (Gleichungen 3.23 bis 3.25). Die Cyclotron-Frequenz wird unter dem Einfluss des *trapping*-Potentials zur reduzierten Cyclotron-Frequenz  $\omega_+$ . Daneben existieren die Magnetron-Frequenz  $\omega_-$  und die axiale Oszillation  $\omega_z$  (Marshall et al., 1998).

$$\omega_+ = \frac{\omega_c}{2} + \sqrt{\left(\frac{\omega_c}{2}\right)^2 - \frac{\omega_z^2}{2}} \quad (3.23)$$

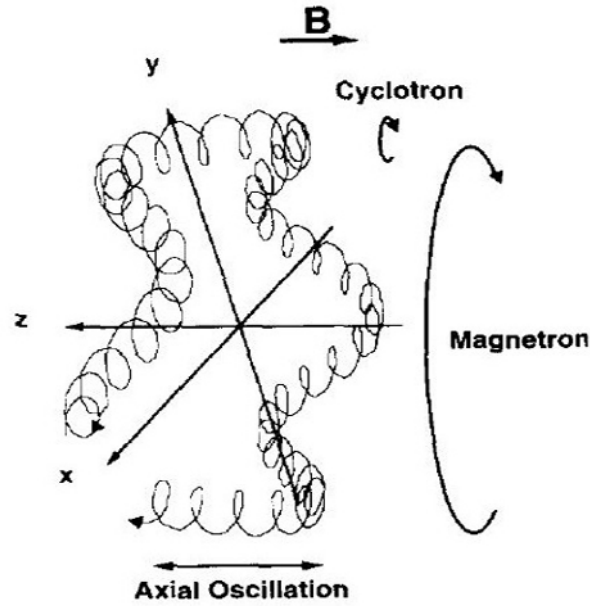


Abbildung 3.9: Reale Ionenbewegungen in der ICR-Zelle

Das homogene Magnetfeld (z-Richtung) und das quadrupolare *trapping*-Potential, erzeugt durch die *trapping*-Elektroden (z-Richtung), bewirken zusammen, neben der Cyclotron-Bewegung, noch die Magnetron-Bewegung sowie die axiale Oszillation (engl.: *axial oscillation*) (Guan und Marshall, 1995)).

$$\omega_- = \frac{\omega_c}{2} - \sqrt{\left(\frac{\omega_c}{2}\right)^2 - \frac{\omega_z^2}{2}} \quad (3.24)$$

$$\omega_z = \sqrt{\frac{2qV_{trap}\alpha}{ma^2}} \quad (3.25)$$

$\omega_+$  = reduzierte Cyclotron-Frequenz,  $\omega_-$  = Magnetron-Frequenz,

$\omega_z$  = axiale Oszillation,  $V_{trap}$  = *trapping*-Spannung,

$\omega_c$  = Winkelgeschwindigkeit (Zyklotronfrequenz),

$\alpha$  = Faktor in Abhängigkeit von der Form der ICR-Zelle,

$a$  = ICR-Zellgröße

Wichtig ist die Unabhängigkeit der drei Gleichungen von  $r$ , dem Radius innerhalb der ICR-Zelle. Dies bedeutet, dass die jeweiligen Frequenzen unabhängig von der Position innerhalb der ICR-Zelle sind. Dennoch beeinflussen sich die drei möglichen Bewegungsmöglichkeiten der Ionen gegenseitig. Bedingt durch Kollisionen kommt es sogar zur Konversion zwischen Magnetron- und

Cyclotron-Bewegung. Die Frequenz ( $\nu_{interconvert}$ ) hierzu ergibt sich aus Gleichung 3.26.

$$\nu_{interconvert} = \frac{9,77601 * 10^6 z V_{quad}}{m d^2 (\nu_+ - \nu_-)} \quad (3.26)$$

$\nu_{interconvert}$  = Frequenz des Übergangs zwischen Cyclotron- und Magnetronbewegung,  $9,77601 * 10^6$  = Skalierungsfaktor (ICR-Zellgröße),  
 $z$  = Vielfaches der Elementarladung,  $V_{quad}$  = *trapping*-Spannung,  
 $m$  = Masse des Ions,  $d$  = Elektrodenabstand,  
 $\nu_+$  = Cyclotron-Frequenz,  $\nu_-$  = Magnetron-Frequenz

Nach der Anregung der Ionen in der ICR-Zelle bedarf es einer kurzen Zeit, bis die Magnetron-Frequenz in die Cyclotron-Frequenz konvertiert wurde. Hiernach kann die Messung des Induktionsstromes durch die Messelektroden bis zum Abklingen der Cyclotron-Bewegung vollzogen werden. Schließlich werden die transienten Cyclotron-Frequenzmuster der unterschiedlichen angeregten Ionen durch Fourier-Transformation aus dem Frequenz-Raum in ein Massenspektrum transformiert. Nötig hierzu ist eine vorherige externe Kalibrierung mit bekannten Substanzmassen.

Im Allgemeinen gilt für FT-ICR Messungen: je länger ein Messintervall für die Messung einer Ionenpopulation innerhalb der ICR-Falle ist (z.B. 0,1 oder 1s), desto größer ist die Massenauflösung mit der das  $m/z$ -Verhältnis der Ionen bestimmt werden kann. Ebenso führt eine Erhöhung der Feldstärke des homogenen Magnetfeldes zu einer Erhöhung der möglichen Massenauflösung und der maximal messbaren Masse eines Ions. Dem entgegen wirken Raumladungseffekte zwischen Ionen, die ab einer bestimmten Ionenanzahl in der ICR-Zelle auftreten und zu Verbreiterungen der Massensignale führen können. Dieser Effekt verstärkt sich bei Ionenpopulation die in ihrem  $m/z$ -Verhältnis sehr nah beieinander liegen, wie z.B. Isotopenpeaks (Marshall et al., 1998).

### 3.5 Untersuchung von Biomolekülen mit hoher Massenauflösung und hoher Massengenauigkeit

Biomoleküle stellen organische Makromoleküle dar, die sich hauptsächlich aus den Elementen Kohlenstoff (C), Wasserstoff (H), Sauerstoff (O), Stickstoff (N), Phosphor (P) und Schwefel (S) zusammensetzen. Unter diesen Elementen überwiegen bei Peptiden, Proteinen und Lipiden in sehr hohem Maße „C“ und „H“. Bei Sacchariden nimmt zusätzlich „O“ einen sehr hohen Massenanteil ein. Aus der natürlichen Isotopenzusammensetzung dieser Elemente ergibt sich für die

Makromoleküle, die aus diesen Elementen zusammengesetzt sind, eine Verteilungspräferenz im hoch aufgelösten Massenspektrum. Diese Verteilungspräferenz äußert sich in der ersten und den folgenden Nachkommastellen des Molekulargewichts (Lehmann et al., 2000; Spengler, 2004; Spengler und Hester, 2008). Dabei spielt zusätzlich die inhomogene Verteilung der proteinogenen Aminosäuren in natürlicherweise vorkommenden Proteinen eine Rolle (Lehmann et al., 2000). Somit können aus einem im Massenspektrum erhaltenen  $m/z$ -Signal, bei entsprechender Massenauflösung und Massenrichtigkeit, Aussagen über die Substanzklasse des verursachenden Ions gemacht werden. Bei Peptidionen erlauben derartige Massenspektren darüber hinaus Rückschlüsse auf deren mögliche Aminosäure-Zusammensetzung sowie posttranslationale Modifikationen (Spengler, 2004; Spengler und Hester, 2008). Eine ausreichende Analytkonzentration ist jedoch Grundvoraussetzung für Massenspektren mit hoher Massenauflösung. Für die bildgebende Massenspektrometrie (engl.: *imaging*) ergeben sich dadurch sehr interessante Möglichkeiten. Durch bildgebende Untersuchungen können so nicht nur Verteilungsmuster verschiedener  $m/z$ -Signale auf einer Probe erzeugt, sondern auch gleichzeitig Aussagen über die Substanzklasse des Signals (Lipid, Peptid, Saccharid, Glykolipid) getroffen werden. Bei vergleichenden Untersuchungen gesunder und krankhafter Zellen oder Gewebe wäre es somit möglich, Aussagen über räumliche Veränderungen erfasster Substanzklassen oder Strukturen (Membrankanäle, Epitope, Signalpeptide, etc.) zu treffen.

### 3.6 Bildgebenden Massenspektrometrie

Die bildgebende Massenspektrometrie korreliert Signale aus Massenspektren, die bei der systematischen, rasternden (engl.: *scanning*) Untersuchung einer Probe gemessen werden, mit ihrem Entstehungsort auf der Probe (siehe Abb.3.10, S.53). Wird die Intensität der in den Spektren aufgetreten Ionensignale farbkodiert, kann man gradierte Verteilungsbilder (engl.: *image*) der Ionen erstellen. Beim LDI/MALDI *imaging* wird die Probe, nicht der Laserstrahl, zur rasternden Untersuchung bewegt. Die massenspektrometrischen Daten werden heutzutage mittels leistungsfähiger Software visualisiert (siehe Kapitel 4.5, S.74). Bei rasternden MALDI-Untersuchungen werden, bedingt durch die direkt benachbarten Desorptionsorte auf der Probe (systematische Untersuchung), besondere Anforderungen an die Probenpräparation gestellt. Eine homogene Matrixpräparation ist wichtig, um stabile Massensignale in den Spektren zu erhalten. Hinzu kommen Aspekte der Analytmigration während der Präparation (Bouschen,

2004; Bouschen und Spengler, 2007). Dies ist bei herkömmlichen MALDI Untersuchungen nicht vorrangig zu beachten. Schwankungen der Signalintensität, verursacht durch die Heterogenität herkömmlicher MALDI Präparationstechniken, werden durch die willkürliche Suche nach Desorptionsorten mit hoher Signalintensität (engl.: *sweet spots*) kompensiert.

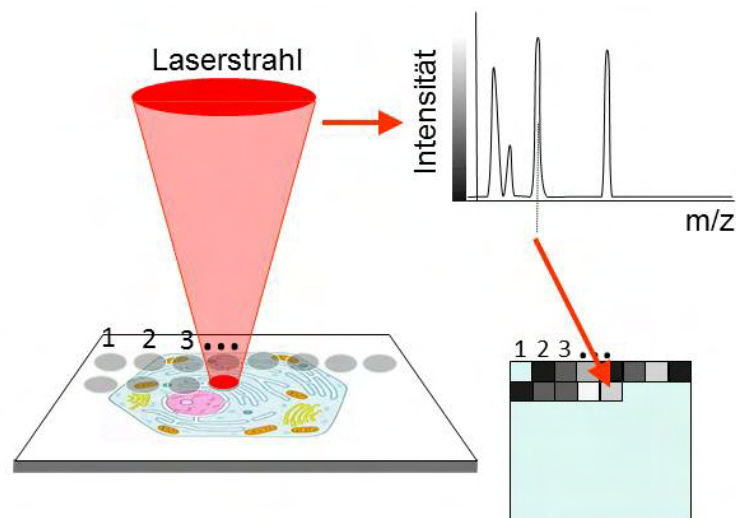


Abbildung 3.10: MALDI *imaging*

Eine homogen präparierte Probe wird Punkt-für-Punkt mit einem Laserstrahl abgerastert. Die entstehenden Massenspektren werden aufgezeichnet und, durch eine geeignete Software, ihrer Quellposition auf der Probe zugeordnet. Die Intensität interessanter Massensignale aus den Spektren wird farbkodiert und damit visualisiert. Die durch die Farbkodierung erzeugten Pixel ergeben das massenspektrometrische Verteilungsbild (MALDI *image*) (modifiziert nach Spengler et al., 2005).

Erste massenspektrometrische Untersuchungen, die die räumliche Verteilung physiologisch wichtiger anorganischer Ionen und Intoxikationen zeigten, wurden schon früh an Gewebeschnitten durchgeführt. Es handelt sich hierbei um LDI Untersuchungen, da keinerlei Matrix verwendet wurde. Die Probenpositionierung erfolgte manuell und die Bildverarbeitung nicht-computerunterstützt. Dennoch konnten Aussagen über die gewebliche Verteilung von z.B.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen gemacht werden (Hillenkamp et al., 1975). Um die Ionenverteilung mit einer möglichst hohen Dichte an Datenpunkten auf der Probenoberfläche darzustellen, wurde mit möglichst kleinem Laserfokusbereich gearbeitet. Die Größe des Laserfokusbereichs entspricht der effektiven lateralen Auflösung. Der Durchmesser des Laserfokus lag im einstelligen Mikrometerbereich. Die zu dieser Zeit kommerziell erhältlichen und hierfür verwendeten Massenspektrometer stammen von der Firma Heraeus und wurden mit dem

Akronym LAMMA (*Laser Microprobe Mass Analyzer*) bezeichnet. Untersuchungen mit diesem Gerätetyp (LAMMA 500, 1000) wurden von zahlreichen Arbeitsgruppen u.a. von Hillenkamp et al. (1975), Seydel et al. (1984) und Feigl et al. (1984) durchgeführt. Eine umfangreiche Beschreibung der technischen Möglichkeiten dieses Gerätetyps wird von Verbueken et al. (1985) gegeben. Auch LMMS (*Laser Microprobe Mass Spectrometry*) wird in diesem Zusammenhang als Abkürzung für lateral hoch auflösende Untersuchungen benutzt (Vaeck und Gijbels, 1990a,b). Bei den LAMMA Geräten wird ein TOF-Massenanalysator verwendet. Schon recht früh wurde die Kombination eines hoch auflösenden FT-ICR Massenanalysators mit LMMS Ionenquellen realisiert, jedoch war eine echte rasternde und damit bildgebende Untersuchung noch nicht möglich (Vaeck und Gijbels, 1990b).

Die fortschreitende technische und analytische Entwicklung ermöglichte nicht nur die automatisierte, rasternde Untersuchung, sondern machte, durch die Entwicklung von MALDI, große organische und Biomoleküle der Analyse zugänglich. Schon zu Beginn der neunziger Jahre wurde ein weiteres, lateral hochauflösendes Massenspektrometer (LAMMA 2000) durch Spengler et al. (1994) entwickelt und vorgestellt. Die laterale Auflösung dieses MS liegt im Bereich von  $1\text{ }\mu\text{m}$  Desorptions-Laserfokusbereich. Das LAMMA 2000 ist in der Lage Probenareale automatisch, mittels eines Piezo betriebenen Probenstisches, abzurastern und verwendet einen TOF Massenanalysator. Computergestützt können Verteilungsbilder der Massensignale des untersuchten Probenareals erstellt werden (Spengler und Hubert, 2002).

Neben dem Ansatz Proben mittels eines hoch-fokussierten Laserstrahls zu untersuchen, wie dies bei den LAMMA Geräten der Fall ist, wurden in jüngerer Zeit ein weiterer experimenteller Ansatz verfolgt. Ein spezieller ToF-Detektor soll die Probenionen, die mittels eines großen Desorptions-Laserfokusbereichs erzeugt werden, lateral hoch auflösen (Luxembourg et al., 2004).

Mittlerweile werden von unterschiedlichen Herstellern fertige kommerzielle Systeme angeboten, die in der Lage sind massenspektrometrische Verteilungsbilder zu generieren. Diese Imaging-Systeme verwenden häufig eine Glasfaseroptik zum Transport des Laserstrahls. Werden Standardoptiken verwendet erreichen diese lediglich Fokusbereich zwischen 20 und  $100\text{ }\mu\text{m}$  (Stoeckli et al., 2002; Kruse und Sweedler, 2003; Jurchen et al., 2005; Verhaert et al., 2007). Häufig liegt der Fokusbereich darüber (Khatib-Shahidi et al., 2006; Chen et al., 2008). Als Massenanalysatoren werden meist ToF- oder Ionenfallen-Massenanalysatoren angeboten. Der Vorteil von ToF Massenana-



lysatoren ist ihre Schnelligkeit, ihre Empfindlichkeit und der große untersuchbare Massenbereich. Ihr Nachteil liegt, nach wie vor, in der unzureichenden Massenauflösung. Ionenfallen-Massenanalysatoren besitzen ebenfalls eine hohe Empfindlichkeit, erlauben hohe Untersuchungsgeschwindigkeiten und bieten zusätzlich noch die Möglichkeit zu komplexen Fragmentierungsexperimenten ( $MS^n$ ). Ionenfallen-Massenanalysatoren zeigen jedoch auch eine niedrige Massenauflösung und niedrige Massengenauigkeit. Neuere Untersuchungen und Entwicklungen in Bezug auf die Kopplung mittlerer lateraler Auflösung mit der hohen Massenauflösung eines FT-ICR Massenspektrometers wurden von Taban et al. (2007) gemacht. Die Kopplung einer automatisch rasternden, lateral hochauflösenden Ionenquelle mit einem Massenspektrometer hoher Massengenauigkeit und Massenauflösung, wie sie ein FT-ICR Massenspektrometer bietet, ermöglichte eine Reihe von Vorteilen im Hinblick auf die Interpretation der massenspektrometrischen Daten.

### 3.7 Zellkultur

Zur Untersuchung interessanter Biomoleküle und deren Verteilungsmuster in biologischen Proben benötigt man ein Modellsystem. Dieses sollte mehrere wichtige Voraussetzungen erfüllen:

- Kommerzielle Zugänglichkeit,
- Einfache Handhabung und Kultivierung,
- Hohe Reproduktionsrate und damit hohe Probenverfügbarkeit und niedrige Wartezeiten,
- Minimum an störenden Komponenten (Matrixeffekte),
- Gewährleistung der Übertragbarkeit von Ergebnissen aus dem Modellsystem auf reale Bedingungen,
- Nicht zu hohe Unterhaltungskosten.
- Ggfs. Vorkenntnisse in Form vorhergehender Untersuchungen (Protein-/DNA-Datenbank)

Diese Bedingungen werden durch sogenannte permanente Zelllinien erfüllt. Als Vorteil dieser Zelllinien ist vor allem ihre leichte Zugänglichkeit zu nennen. Sie sind bei einschlägigen Zellbanken erhältlich. Zur Kultivierung sind Sterilbedingungen notwendig, die durch geeignete Apparaturen sichergestellt werden.

Im Vergleich dazu sind Gewebeschnitte einfacher handhabbar, jedoch deutlich schwieriger zugänglich (z.B. Frischsektionen von Patienten oder von Versuchstieren). Gewebeschnitte sind analytisch, als Verband unterschiedlicher Zelltypen bzw. Zelldifferenzierungen, leichter räumlich erfassbar. Vorhandene Strukturen sind i.d.R. größer und deshalb leichter zu untersuchen. Ist ein Mikrotom oder Kryomikrotom vorhanden lassen sich Dünnschnitte, wie sie z.B. für die Mikroskopie aber auch die Massenspektrometrie benötigt werden, vergleichsweise einfach herstellen. Sollen Dünnschnitte aus Versuchstieren erstellt werden, so erfordert die Haltung derer bestimmte personelle Grundvoraussetzungen (für die Tierpflege berechnigte Personen). Die bereits angesprochenen humanen Gewebeproben dürfen allein durch Ärzte entnommen werden.

Permanente Zelllinien werden als sogenannte entartete Zelllinien bezeichnet. Sie werden z.B. aus Krebssektionen gewonnen und weisen ein verändertes Genom auf. Eine natürliche Kontrolle des Zellzyklus findet nicht mehr statt und die Zellen sind immortal. Ihre genomische Übereinstimmung mit nicht-entarteten Zellen ist jedoch ausreichend groß, um permanente Zellkulturen als Modellsystem verwenden zu können. Permanente Zelllinien stellen in unterschiedlichen Bereichen der Molekularbiologie Standardsysteme für Experimente dar. Es gibt eine Vielzahl der verschiedensten Zelllinien. Sie unterscheiden sich aufgrund ihrer Gewebeherkunft und dem Grad der Genomveränderung.

Werden nicht-entartete Zellen direkt aus Frischsektionen kultiviert bezeichnet man sie als primäre/transiente Zellkulturen. Ihre Zellzykluskontrolle ist voll funktionsfähig, weshalb sie nach einer bestimmten Anzahl an Zellteilungen in einen teilungsinaktiven Zustand übergehen (siehe Abb.3.11, S.57). Sie sind dann nicht mehr weiter subkultivierbar, sondern im G<sub>0</sub>-Stadium arretiert.

Permanente Zelllinien können, nachdem sie einmal gewonnen wurden, auf unterschiedliche Weise weiter kultiviert werden. Dies hängt von der Entartung des Zellgenoms und von der Gewebeherkunft der Zellen ab. Zusätzlich spielt das Wachstum der Zellen eine Rolle, man unterscheidet hier zwischen adhärentem und nicht-adhärentem Wachstum der Zellkulturzellen. Adhärente Zellen benötigen eine geeignete Oberfläche im Kulturgefäß, um wachsen zu können. Hierauf haften sie sich zur Proliferation fest (Adhäsion). Im Gegensatz hierzu werden nicht-adhärente Zelllinien als Suspensionskultur kultiviert. Die Adhäsion von Zellkulturzellen kann u.U. durch die Zugabe von Anheftungsfaktoren ins Medium erreicht werden (Steimer und Klagsbrunn, 1981; Schakenraad et al., 1987; Kim et al., 1992; Roberts et al., 1998; Dang et al., 2001). Beide Wachstumsfor-

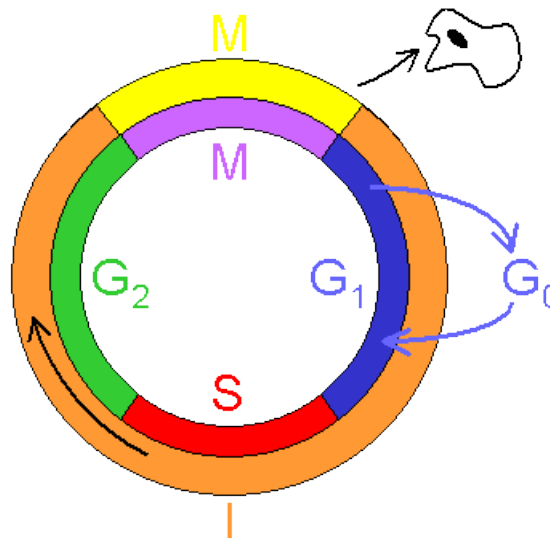


Abbildung 3.11: Zellzyklus einer eukaryotischen Zelle

Im Zellzyklus einer eukaryotischen Zelle unterscheidet man zunächst zwei Hauptphasen: die Mitose (M) und die Interphase (I). Die Interphase kann weiter in G<sub>1</sub>-, S- und G<sub>2</sub>-Phase untergliedert werden. Die G<sub>1</sub>-Phase ist durch keinerlei reproduktive Aktivität gekennzeichnet. In der S-Phase (Synthese) wird die Menge des Erbmateri- als ver- doppelt. Die Zelle ist nun Tetraploid. Die G<sub>2</sub>-Phase be- reitet die Verteilung des Erbmateri- als auf zwei identische Zellen vor (Mitose). Anschließend wächst die Zelle wieder zur spezifischen Größe heran und kann eine neue Teilung vollziehen oder in die Ruhephase (G<sub>0</sub>) einer differenzier- ten Zelle übertreten. Zellen in G<sub>0</sub>-Phase führen keine wei- tere Zellteilung mehr aus (Wikipedia-Autor-Unbekannt, 27.04.2008).

men besitzen Vor- und Nachteile in Bezug auf die Subkultivierung. Adhären- te Zellkulturen erleichtern jedoch die experimentelle Arbeit immens. Die recht ro- buste Verankerung der Zellen auf dem Untergrund bietet Vorteile z.B. bei präpa- rativen Arbeiten. Allgemeine Aspekte und grundlegende Techniken der Zellkul- tur sind der einführenden Literatur zur Zellkultur zu entnehmen (Lindl, 2002). Einige wichtige Aspekte der Zellkultur werden im Folgenden näher erläutert.

Die Subkultivierung von Zellkulturen ist vergleichsweise einfach, muss je- doch unter sterilen Bedingungen erfolgen. An Steriltechnik muss eine Sicher- heitswerkbank (engl.: *workbench*, *benchflow*) und ein Zellkulturschrank (Inku- bator), sowie ein Autoklav vorhanden sein. Die Sicherheitswerkbank ermöglicht

die Subkultivierung der Zellkulturzellen in gefilterter, steriler Atmosphäre. Der Zellkulturschrank reguliert die Umgebungsbedingungen (Temperatur, relative Luftfeuchtigkeit, CO<sub>2</sub> Partialdruck) während des Zellwachstums. Der Autoklav ist notwendig, um Geräte, Abfälle und Chemikalien sterilisieren zu können. Zusätzlich sind Zellkulturmedien und Spezialchemikalien (siehe 4.9.1, S.80), sowie spezielle Zellkulturgefäße notwendig. Manuelle Vorgänge, wie z.B. pipettieren und abfüllen, müssen an eine sterile Arbeitsweise angepasst werden. Kontamination der Zellkultur sind jedoch, gerade in der Anfangsphase der Kultivierung, nicht auszuschließen. Hinzu kommt, dass Kontaminationen nicht nur durch den Kultivierenden und eine evtl. unsaubere Arbeitsweise verursacht werden können, sondern auch die Chemikalien und Medien, die heutzutage weitestgehend gebrauchsfertig bezogen werden, eine mögliche Kontaminationsquelle darstellen. Die Subkultivierung der permanenten Zelllinien erfolgt in einem Abstand von 2-4 Tagen. Dies hängt von der Wachstumsrate der Zellkulturzellen ab. Zellkulturzellen können wenige Stunden nach der Subkultivierung untersucht werden, da das Festwachsen der Zellen auf dem Substrat nach dem Absinken der Zellen schnell erfolgt. Die Subkultivierung stellt für die Zellen eine nicht unwesentliche chemische und physikalische Belastung dar (Bereiter-Hahn et al., 1990). Durch zeitversetztes Arbeiten kann eine permanente Probenverfügbarkeit, bei ausreichender Ruhezeit für die Zellen, erreicht werden.

### 3.7.1 Bestandteile von klassischen Zellkulturmedien

Die Zellkultur wird klassischerweise mit sogenannten serumhaltigen Medien durchgeführt. Als Serum bezeichnet man ein Schlachtnebenprodukt, das fötale Kälberserum (FCS). Es handelt sich dabei um eine Blutfraktion, die einem ungeborenen, bei der Schlachtung freigewordenen, Kuhfötus entnommen und aufbereitet wird. Da es sich um einen Anästhesie freien Prozess handelt ist die Gewinnung von FCS aus ethischen Gesichtspunkten nicht ganz unproblematisch. Das Blut wird durch eine Direktpunktion des schlagenden Fötuserzens gewonnen. Bei Serum handelt es sich also um ein Naturprodukt, das bestimmten Schwankungen der Inhaltsstoffe unterworfen ist. Bedingt durch die komplexe Zusammensetzung des FCS ist nur ein kleiner Teil der Inhaltsstoffe bekannt. FCS ist in der klassischen Zellkultur unerlässlich, da bestimmte Wachstumsfaktoren, die für die Zellproliferation benötigt werden, enthalten sind. Die Variabilität der FCS-Zusammensetzung, sowie die große Anzahl unbekannter Komponenten macht die Verwendung von FCS zur Herstellung massenspektrometrischer Proben problematisch. Ein Teil der in FCS enthaltenen Komponenten ist in Tabelle 6.1 (S.208) aufgeführt. Weitere Komponenten klassischer

Zellkulturmedien sind: Makronährstoffe (Zucker, Aminosäuren), Vitamine und Spurenelemente. Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA) sowie langzeitstabiles Glutamin müssen bei bestimmten Zelllinien separat zugesetzt werden. Der Zusatz von Antibiotika (gewöhnlich Penicillin und Streptomycin) wird in der Literatur unterschiedlich beurteilt. Im Interesse der Wirksamkeit im Bedarfsfall wurde in eigener Zellkultur auf Antibiose verzichtet.

### 3.7.2 Serumfreie Zellkulturmedien

Zur Schaffung definierter Zellkulturbedingungen werden schon seit einigen Jahren sogenannte serumfreie Medien ohne FCS angeboten. Der unterschiedliche hohe proteinische Anteil der Medien wird in Form rekombinant hergestellter Proteine (z.B. rekombinantes humanes Insulin), von Proteinhydrolysaten (tierisch oder pflanzlich) oder Rinderserumalbumin (aus Rinderblut) zugesetzt. Für spezielle Zelllinien sind nahezu komplett proteinfreie Medien verfügbar. Besonders für kommerziell genutzte Zelllinien, z.B. für die Antikörperherstellung (Hybridomazellen), sind diese Medien von großem Vorteil, da sie die Aufreinigung der an das Medium sezernierten Antikörper erleichtern. Im Bedarfsfall werden gezielt Wachstumsfaktoren zugesetzt. Bei Falkner et al. (2006) wird ein sehr guter Überblick über die Vielzahl der erhältlichen serumfreien Medien gegeben.

Für analytische Verfahren liegt die Bedeutung eines definierten Zellkulturmediums in der Senkung von Matrixeffekten und Hintergrundsignalen. Dies gilt besonders für massenspektrometrisch zu untersuchende Zellproben. Auch bei tryptisch verdauten Proben können so vermehrt Störungen auftreten (Finehout et al., 2005). Trotz der Kenntnis der Quellen möglicher Hintergrundsignale sind diese jedoch nicht gänzlich auszuschließen. Jedoch besteht die Möglichkeit der Vorhersage evtl. auftretender Massensignale durch Kenntnis der Bestandteile des Zellkulturmediums. So können Zellsignale und zellfremde Signale unterschieden werden. Dies bedeutet eine deutliche Vereinfachung für die Auswertung massenspektrometrischer Daten.

## 3.8 Kompatible Lösungsmittel (*compatible solutes*)

Wildwachsende Pflanzen sind mit unterschiedlichen Formen von Stress (Salzstress, Trockenstress, Kältestress, etc.) konfrontiert. Viele dieser Stressformen gehen mit einer Abnahme des pflanzenverfügbaren Wassers einher. Sie bewirken ein Sinken des Wasserpotentials des Bodens und erschweren so der Pflanze den Zugang zu Wasser. Sinkt der Gehalt an freiem Wasser durch erschwerte Wasseraufnahme in den Pflanzenzellen zu stark ab, beobachtet man Welken. Die

zelluläre Ursache ist das Absinken der Turgoreszenz, die schließlich ein Ablösen der Plasmamembran (Plasmalemma) von der Zellwand bewirkt (Plasmolyse). Zunehmender Mangel an freiem Wasser führt zur steigender Einschränkung physiologischer Funktionen in der Zelle und kann schließlich die Desintegration der Plasmalemma zur Folge haben. Hitze und Trockenheit bewirken dies durch starke Verdunstung, Frost durch Gefrieren des Wasser in den interzellulären Räumen. Beides führt zur Entfernung von Wasser aus dem Innern der Zelle. Je nach Osmolarität des Zellsaftes (Cytoplasma, Vakuole) besteht die Gefahr, dass zu viel Wasser aus dem Zellinnern entfernt wird und alle biologischen Prozesse zum Stillstand kommen. Dies bezieht sich nicht nur auf enzymatische Prozesse bei denen Wasser unerlässlich ist, sondern auch auf die Bildung von Eiskristallen im Zellinnern, die eine mechanische Zerstörung der Zellkompartimentierung (Plasmalemma, Tonoplast, Zellorganellmembranen) und damit i.d.R. das Absterben der Zelle zur Folge haben (Beck et al., 2007). Die Erhöhung der Konzentration osmotisch aktiver Substanzen im Zellinnern wirkt Plasmolyse und mechanischer Zerstörung entgegen. Eine solche Veränderung der Zusammensetzung des Cytoplasma wird durch Akklimatisationsphasen bei akklimatisierbaren Pflanzen induziert. Während solcher Akklimatisationsphasen steigt die Intensität des Stressors sukzessive an, die Pflanze wird stimuliert und die Hochregulation der schützenden Substanzen induziert. Soll z.B. bei Pflanzen, die an Kälte akklimatisiert werden können, Frostresistenz erzielt werden, werden die Pflanzen einige Wochen bei *chilling*-Temperaturen (Temperaturen knapp oberhalb des Gefrierpunktes) gehalten (Köstler, 2003). Die Moleküle dieser Schutzsubstanzen weisen ganz besondere Eigenschaften auf. Sie senken den Gefrierpunkt des Cytoplasma und sind in der Lage, die Aufgabe des freien Wassers teilweise zu übernehmen. Zudem bauen sie ein zusätzliches osmotisches Potential auf, um weiterem Verlust freien Wassers entgegen zu wirken. Zellkomponenten des zellulären Haushaltes (*house keeping enzymes*) können sich in diesem Milieu bewegen und darin weiterhin ihre Aufgabe erfüllen ohne zu denaturieren. Die Moleküle, die das Lösungsmittel Wasser ersetzen, heißen *compatible solutes* – kompatible Lösungsmittel (Hare et al., 1998). Von unterschiedlichen Pflanzen werden hierzu Aminosäuren, quartäre Ammoniumverbindungen, Saccharide und Zuckeralkohole wie z.B. D-Mannitol (Stoop et al., 1996; Sickler et al., 2007) verstärkt synthetisiert.

Die Eigenschaften dieser *compatible solutes* könnten bei der Entwicklung neuer Matrixgemische zur MALDI Präparation biologischer Proben von Nutzen sein.

### 3.9 Ziel dieser Arbeit

Auf die funktionelle Bedeutung von Biomolekülen, im Kontext ihrer lokalen Organisation (z.B. in der Zellmembran), wurde zu Beginn der Einleitung eingegangen. Diese Bewegungen erfolgen im Nanometerbereich und sind analytisch nur sehr schwer zugänglich. Bei Verfahren, die elektromagnetische Wellen z.B. in Form von Laserstrahlen zur Analytik verwenden, setzen die Grundsätze der Optik und Physik elektromagnetischer Wellen hier eine ganz klare Grenze in Form der Bragg-Gleichung. Objekte können auf konventionelle Weise nicht voneinander optisch getrennt (aufgelöst) werden, wenn sie sich näher zueinander befinden als die halbe Wellenlänge des zur Analyse verwendeten Lichts. Die Massenspektrometrie als Analyseverfahren nutzt jedoch nicht unmittelbar optische Eigenschaften des Analyten, wie z.B. die Mikroskopie. Vielmehr bedient sie sich elektromagnetischer Wellen als Mittel zur Erzeugung von Ionen via LDI oder MALDI. Deshalb müssen zusätzliche Gesichtspunkte, wie die Empfindlichkeit des Massenspektrometers in Bezug auf die Menge an erzeugten Ionen beachtet werden. Da von einer Probe nur eine bestimmte Menge an Ionen pro Fläche gewonnen werden kann, determiniert die Geräteempfindlichkeit somit letztlich die laterale Auflösung bei der Untersuchung einer Probe. Deshalb werden herkömmlicherweise zur MALDI-Untersuchung häufig empfindliche ToF Massenanalysatoren verwendet. Dieser Analysatortyp besitzt jedoch in Bezug auf seine Massenauflösung und die Kapazität zur Fragmentationenerzeugung ( $MS^n$ ) eingeschränkte Möglichkeiten. Die Entwicklung einer neuen rasternden, lateral hochauflösenden Atmosphärendruck MALDI Ionenquelle sollte diese Einschränkungen beseitigen, da diese mit linearen Ionenfallen und FT-ICR Massenanalysatoren verwendet werden kann. Die Ionenquelle, die hier am *Finnigan* LTQ-FT MS verwendet wurde, sollte somit den Zugang zu CID Experimenten mittels LTQ MS (Fragmentationenanalyse) und zu hoch-massenaufgelösten Spektren mittels FT MS ermöglichen. Zusätzlich wurde die Etablierung neuer Zellkultivierungstechniken, zur besseren Kontrolle der Kulturbedingungen bei der Herstellung von Zellproben, angestrebt und umgesetzt. Darüber hinaus ergänzt die Entwicklung neuer Präparationsverfahren zur Präparation biologischer Proben, auf der Basis eines bionischen Ansatzes, die apparativ-entwickelnde Fragestellung dieser Arbeit.

## Kapitel 4

# Material und Methoden

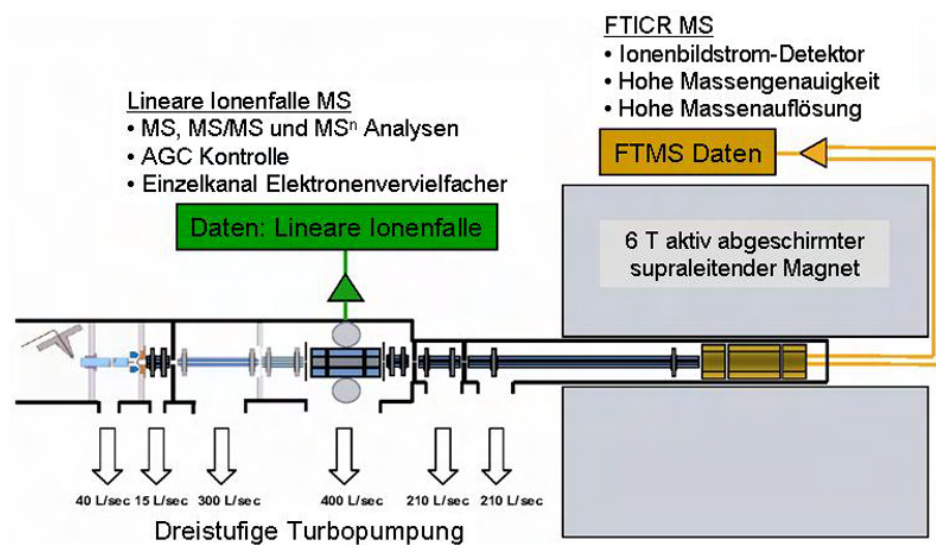
### 4.1 Das Massenspektrometer *Finnigan* LTQ-FT und die zugehörige Bediensoftware (LTQTune™, Xcalibur™)

Bei dem für die Untersuchungen verwendeten Massenspektrometer (MS) handelt es sich um das *Finnigan* LTQ-FT. Das LTQ-FT ist ein Hybridmassenspektrometer, das aus zwei nahezu unabhängig voneinander operierenden Massenspektrometern besteht. Beide Massenspektrometer verwenden unterschiedliche Massenanalysatoren. Das LTQ MS arbeitet mit einer linearen Quadrupolionenfalle, das FT MS mit einer zylindrischen Fourier-Transform-Ionen-Cyclotron-Resonanz (FT-ICR) Messzelle. Die Anordnung der beiden Massenanalysatoren wird in Abbildung 4.1 (S.63) dargestellt. Zusätzlich siehe auch Thermo Electron Corporation, Thermo Electron Corporation (2006a) und Thermo Electron Corporation (2006b). Die Funktionsprinzipien der verwendeten Massenanalysatoren wurden bereits in der Einleitung (Kapitel 3.4.5, S. 40) beschrieben.

Die Steuerung der beiden MS erfolgt über LTQTune. Die Gerätekonfiguration wird über den sogenannten *device file* erzeugt und ist obligater Bestandteil für den Betrieb des LTQ-FT. Xcalibur dient der Betrachtung gewonnener massenspektrometrischer Daten und der Erzeugung sogenannter *instrument methods* (Thermo Fisher Scientific, 2009). Die unterschiedlichen Softwareversionen sind downwards, jedoch nicht upwards kompatibel. Neuere Versionen können ältere Daten handhaben, jedoch nicht umgekehrt. Zudem lassen sich einmal mit einer neueren Xcalibur Version geöffnete Daten nicht mehr mit einer älteren öffnen.

Beide Massenspektrometer weisen ein unterschiedliches Detektionsprinzip auf. Das FT MS erreicht eine Massenauflösung von 12500 bis 500000 (LTQ FT



Abbildung 4.1: *Finnigan* LTQ-FT MS

Die Übersicht über das *Finnigan* LTQ-FT Massenspektrometer zeigt die Messmodi/das Detektionsprinzip beider Massenspektrometer, die Anordnung der ionenoptischen Elemente des LTQ MS (links), die Anordnung der ionenoptischen Elemente des FT-ICR MS mit dem 6T supraleitenden Magneten (rechts) sowie die Leistungsfähigkeit des Vakuumpumpensystems ([L/sec]).

Ultra: 1000000) über  $m/z$  400Da, bei einer spezifizierten Massengenauigkeit von  $<2\text{ppm}$  (LTQ-FT Ultra:  $<1,2\text{ppm}$ ). Das LTQ MS liegt bei einer Massenauflösung von  $\approx 2000$  über  $m/z$  400Da und einer Massengenauigkeit im Bereich von 0,1Da ( $\approx 120\text{ppm}$ ). Beide Massenspektrometer zeigen große Unterschiede ihrer Empfindlichkeit (minimal detektierbare Ionenmenge, *target*-Wert). Die Ionenmenge mit der das FT MS eine Standard Untersuchung des gesamten Messbereiches (engl.: *full scan*,  $m/z$  50-2000Da) durchführt liegt etwa bei 500000 Ionen, das LTQ MS benötigt hierfür 40000 Ionen. Die Empfindlichkeit spricht also zugunsten des LTQ MS und liegt etwa 10 bis 12-mal höher. Der Unterschied resultiert vor allem aus Ionentransferverlusten.

Im Verlauf der Arbeit erweiterte sich Messbereich von  $m/z$  50-2000Da auf 50-4000Da. Die Messungen erfolgten jedoch aus Gründen der Vergleichbarkeit kontinuierlich bis maximal  $m/z$  2000Da. Im Jahr 2005 wurde das komplette LTQ MS ausgetauscht.

Wird das LTQ MS allein betrieben, so ist dennoch der LTQ-FT *device file* (nicht der LTQ stand alone *device file*) zu installieren (LTQ-FT *device file* Version 1.0, später Version 2.0). Nur der LTQ-FT *device file* enthält folgende wichtige Menüpunkte, die für die externe Triggerung des LTQ-FT unerlässlich sind: Diagnostics → Tools → Toggles, optional Spare1, 2, 3 Schalter (Menüführung: LTQTune → Diagnostics → Toggles → Spare1). Näheres hierzu ist in Kapitel

Tabelle 4.1: HARDWARE-SOFTWARE-KONFIGURATION (LTQ-FT, LTQ-TUNE/*device file*, XCALIBUR)

Tabellarische Übersicht verwendeter Hardware-Software-Kombinationen am *Finnigan* LTQ-FT. Die Hardware wird über den Zeitpunkt der Verfügbarkeit, die Software mit der Versionsnummer spezifiziert.

LTQ-FT (Jahr)	LTQTune/ <i>device file</i> (Version)	Xcalibur (Version)
2003	1.0	1.4 SR 1
2005 (neue LTQ)	1.0	1.4 SR 1 oder 2.0
2008 (LTQ-FT Ultra)	2.0	2.0

5.1.7 (S.112) und Kapitel 5.1.7.3 (S.118) beschrieben.

Eine Übersicht der im Verlauf der Arbeit geänderten und lauffähigen Hardware-Software-Kombinationen ist in Tabelle 4.1 (Seite 64) gegeben.

Der Messbetrieb des LTQ MS wurde durch die erfolgte Hardwareänderung nicht wesentlich verändert. Anders jedoch verhielt es sich jedoch mit der Installation des LTQ-FT Ultra Upgrades und der Installation einer neuen FT-ICR Zelle. Die neue ICR Zelle sollte, laut Spezifikation des Herstellers, eine größere Ionenkapazität, höhere Sensitivität, verbesserte Massengenauigkeit und höhere Massenauflösung aufweisen. Die Erhöhung der Sensitivität hätte in Bezug auf die SMALDI Messungen, in Kombination mit der verbesserten Massengenauigkeit und der verbesserten Massenauflösung, eine sehr effiziente Verbesserung des ICR Messbetriebes dargestellt. Leider war das nicht der Fall. Im Gegenteil, die Kalibrierroutine des LTQ-FT zeigte nach der Installation des Upgrades regelmäßig, gerade bei niedrigen Ionenmengen, ein Kalibrierungsproblem und lag regelmäßig außerhalb der Spezifikationen. FT-ICR Messungen die vor der Installation des Upgrades noch möglich waren konnten nun, verursacht durch die verschlechterte Sensitivität, nicht mehr durchgeführt werden. Einschränkungen des Massenbereiches, z.B. auf einen Bereich zwischen  $m/z$  100-1000Da, bewirkten bei der alten ICR Zelle einen deutlichen Sensitivitätsgewinn. Dies war bei der ICR Ultra Zelle nicht mehr festzustellen. Auch Veränderungen bestimmter Geräteparameter (Zellspannungen: *excitation voltage*, *trapping voltage*) erbrachten keine Verbesserung.

#### 4.1.1 Kalibrierung und Geräteparameter

Die Massenrichtigkeit des FT MS verschiebt sich innerhalb sieben Tagen so weit, dass sie außerhalb der Herstellerspezifikationen liegt und das Gerät kalibriert werden muss. Die Kalibrierung erfolgt in Form einer automatischen oder halb-

automatischen Kalibrieroutine (Thermo Electron Corporation, 2004, 2006b). Zur Kalibrierung wird ein kontinuierlicher Ionenstrom benötigt, der durch eine Electrospray (ESI) oder nanoESI (nESI) Ionenquelle erzeugt wird. Der Unterschied dieser beiden Ionenquellen liegt im Analytverbrauch. Die Kalibrierung wurde stets mit der nESI Ionenquelle und halbautomatischer Kalibrieroutine (Menüführung: LTQTune → Control → Calibrate → semi-automatic) durchgeführt.

Zur Kalibrierung musste zu Beginn der Arbeit stets die AP-SMALDI Ionenquelle demontiert werden. Dies konnte durch ein Adaptersystem, das ebenfalls ein Ergebnis dieser Arbeit darstellt, umgangen werden. Der Betrieb der AP-SMALDI Ionenquelle wurde hierdurch stark vereinfacht (siehe Kapitel 5.1.6, S.111).

Zur Kalibrierung wurde eine offline nano ESI Nadel mit einer Öffnungsweite von mindestens 5-10  $\mu\text{m}$  und mindestens 10  $\mu\text{L}$  ESI Kalibrierlösung (engl.: *tuning solution*, Zusammensetzung siehe Tab.4.2, S.66) verwendet. Die gewählte Nadelöffnungsweite gewährleistet ein ausreichend hohes Ionensignal. Das Ionensignal wird beim LTQ-FT als *normalized level* (NL) angegeben. Zur einwandfreien Kalibrierung sind NL Werte von mind.  $5 \times 10^5$  und gelegentlich eine zusätzliche Messoptimierung auf die Masse  $m/z$  524Da nötig. Die Potentialdifferenz zwischen Spraynadel und Einlassöffnung des MS (engl.: *orifice*) betrug im positiven Kalibriermodus 1,2 bis 1,5 kV. Weitere wichtige Spannungswerte sind die Kapillarspannung (5 bis 45 V) und die Tubelens-Spannung (maximal 120 V). Über die Tubelens-Spannung kann eine Diskriminierung von großen oder kleinen Ionen erzielt werden. Der Wert betrug deshalb bei den *imaging* Messungen etwa 100 V, um die Diskriminierung kleinerer Ionen zu verhindern.

#### 4.1.2 Automatic Gain Control (AGC) – Stetigkeit des Ionensignals ohne AGC

Die Messungen des LTQ MS oder des FT MS sind abhängig von der Menge der Ionen, die sich innerhalb des Massenanalysators befinden. Experimentell konnte gezeigt werden, dass eine zu niedrige Ionenmenge im Innern der LTQ zu einer leichten Unterschätzung eines gegebenen  $m/z$ -Verhältnisses führt. Beim FT MS führen zu wenige Ionen lediglich zum Ausbleiben des massenspektrometrischen Signals (unterhalb der Geräteempfindlichkeit). Eine zu große Ionenmenge führt bei beiden Massenanalysatoren zu Raumladungs- und Feldeffekten, die sowohl die Massengenauigkeit als auch die Massenauflösung negativ beeinträchtigen. Eine stark fluktuierende Ionenmenge kann somit zu fehlerhaften Masseninformationen führen. Gerade für den Betrieb mit diskontinuierlichen Ionisations-

Tabelle 4.2: STANDARD ESI KALIBRIERLÖSUNG

Zusammensetzung der Standard ESI Kalibrierlösung der Firma Thermo Scientific (Kalibrier-substanzen und Lösungsmittel).

Komponenten und Lösemittel	Monoisotopische Masse	Konzentration (mol/L, Vol. %)
Lösemittel Acetonitril ( $\text{CH}_3\text{CN}$ )		50 %
Lösemittel Methanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ )		25 %
Lösemittel Wasser ( $\text{H}_2\text{O}$ )		25 %
Lösemittel Essigsäure ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ )		1 %
Koffein fest	195,0882 (+1)	$5,1 \times 10^{-3}$ mol/L
MRFA (Met–Arg–Phe–Ala) fest	524,2655 (+1)	$1,7 \times 10^{-5}$ mol/L
Ultramark 1621 (Moini, 1994) flüssig	MW Bereich	$1 \times 10^{-3}$ %

verfahren wie MALDI ist dieser Aspekt zu beachten.

Zu Optimierung der Ionenmenge im Massenanalysator verwendet das LTQ-FT die *Automatic Gain Control* (AGC). Diese Funktion führt einen sogenannten *pre scan* durch. Der *pre scan* dient zur Bestimmung der Ionenflussdichte in den Massenanalysator. Bei bekannter Ionenflussdichte kann ein Zeitintervall (Öffnungszeit, Injektionszeit) bestimmt werden, in dem die optimale Ionenmenge in den Massenanalysator gelangt. Das Zeitintervall wird als Injektionszeit (engl.: *injection time*, IT) bezeichnet. Durch Variation der IT wird also die Ionenmenge im Massenanalysator konstant gehalten. Das Arbeitsprinzip der AGC besteht aus zwei Messschritten: dem *pre scan* und dem Massenscan. Bei MALDI Messungen und speziell *imaging* Messungen ist diese Vorgehensweise aus unterschiedlichen Gesichtspunkte nicht anwendbar (Probenmenge, Probenbeschaffenheit, Signalkontinuität). Ein Hauptgrund ist vor allem die meist geringe Probenmenge. Signale aus der obersten Probenschicht könnten im *pre scan* verloren gehen. *imaging* Messungen müssen demnach ohne AGC durchgeführt werden (Menüführung: LTQTune → Diagnostics → Tools → Toggles → AGC on/off). Dies ist möglich ohne die Messgenauigkeit des MS zu beeinträchtigen und konnte anhand von Einzelschussmessungen gezeigt werden (siehe Abb.4.2, S.67).

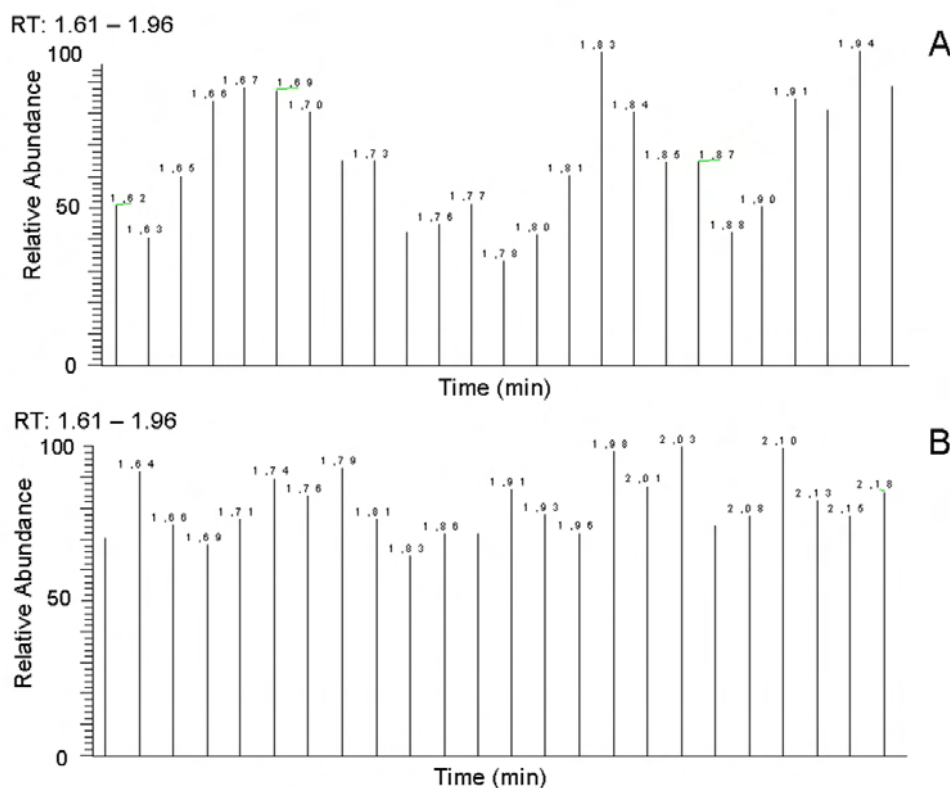


Abbildung 4.2: Totalionenstrom (TIC) des LTQ und ICR MS (Einzelschussbetrieb)

Totalionenstrom (TIC) des LTQ MS (A) und FT MS (B), als *normalized level* (NL), bei ausgeschaltetem AGC. Das Signal ist stetig und zeigt weder Effekte von zu vielen noch von zu wenig Ionen in den beiden Massenanalysatoren.

## 4.2 AP-SMALDI Ionenquelle

Bei der neu entwickelten AP-SMALDI Ionenquelle handelt es sich um ein wesentliches Ergebnis dieser Arbeit, deshalb erfolgt deren ausführliche Beschreibung im Ergebnisteil (Kapitel 5.1.1, S.99). Wesentliches Charakteristikum der neuen AP-SMALDI Ionenquelle ist ihr modularer Aufbau (siehe Abb.4.3, S.68). Die insgesamt drei Module befinden sich in unterschiedlicher Position zum LTQ MS. Modul 1 befindet sich oberhalb des LTQ MS, die Module 2 und 3 sind vorn, axial vor dessen Einlassöffnung positioniert. Modul 1 besteht aus dem Desorptions-/Ionisationslaser sowie Teilen der Laseroptik, Modul 2 trägt die Kernkomponenten der Ionen- und Laseroptik und Modul 3 das Verfahrenssystem (x,y,z-stage) zur exakten Probenpositionierung. Die Module 2 und 3 sind so konzipiert, dass sie gegebenenfalls einen Betrieb unter Vorvakuumdruck ( $5 \times 10^{-3}$  mbar) ermöglichen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden lediglich Untersuchungen unter Atmo-

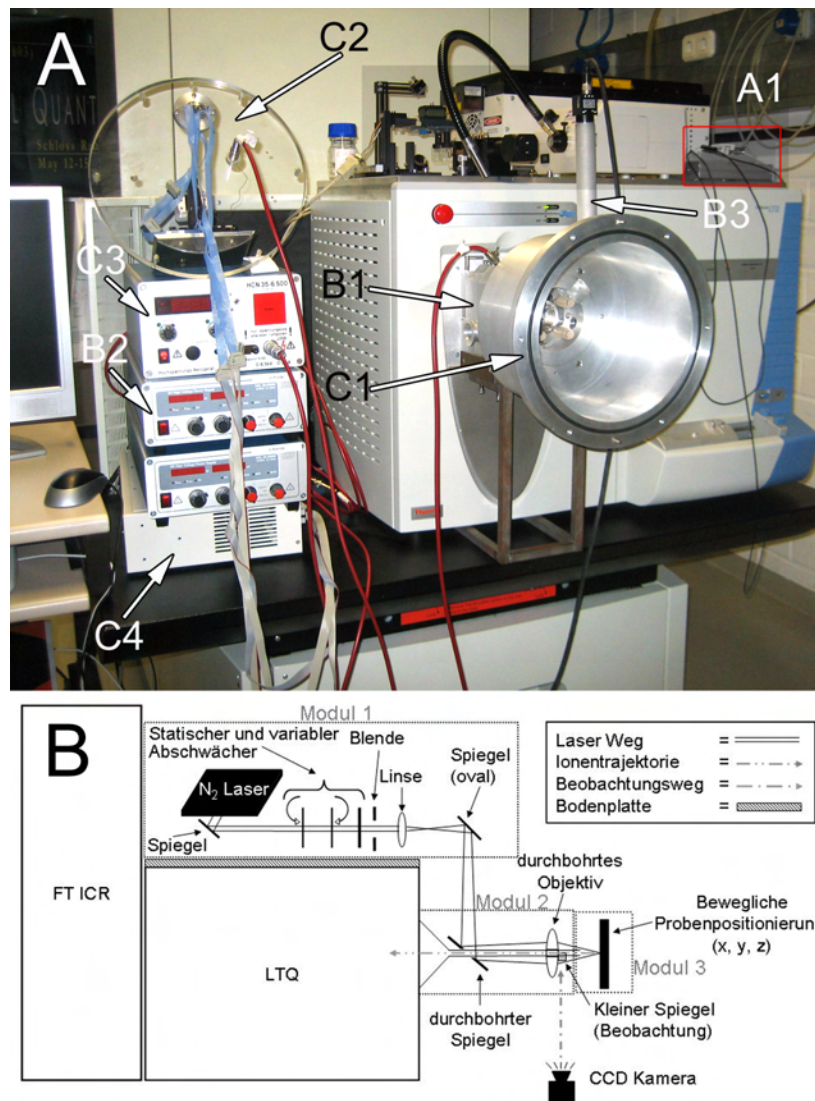


Abbildung 4.3: AP-SMALDI Ionenquelle am *Finnigan* LTQ-FT MS (Foto, Schemazeichnung)

(A) Komponenten der neuen AP-SMALDI Ionenquelle installiert am *Finnigan* LTQ-FT MS. A1 = Modul 1 auf massiver Aluminiumplatte; B1 = Modul 2 mit sichtbarem Vakuumflansch, B2 = externe Spannungsversorgung der Ionenblende, B3 = Beobachtungsoptik (Teleskoprohr, s/w CCD-Kamera); C1 = Modul 3, C2 = Plexiglasdeckel (Verschluss Modul 3) mit Trägerplatte des x,y,z-Probenverfahrensystems und System, C3 = externe Spannungsversorgung (Probenhalter), C4 = Verstärker (Ansteuerung x,y,z-Probenverfahrensystem). Unterhalb der Beschriftung „A1“ (kleines getöntes Rechteck, rot umrandet): USB-Controller, Verstärkerendstufe (Schrittmotorstromversorgung, Positionierung des variablen Abschwächers). (B) Schemazeichnung (relative Position der Module zueinander).

sphärendruckbedingungen (AP) durchgeführt. Zur Dokumentation des Aufbaus der AP-SMALDI Ionenquelle wurden schematische Abbildungen eingefügt.

Die Möglichkeiten der Datenakquisition mit der neuen AP-SMALDI Ionen-

quelle sind im Kapitel 4.5 (S.74) dargestellt.

Die Charakteristika der verwendeten vorkonfigurierten Komponenten werden im Folgenden aufgeführt.

#### 4.2.1 Stickstofflaser

Beim ausgewählten Stickstofflaser handelt es sich um den LTB MNL 202-LD Laser (Lasertechnik Berlin (LTB)), einen niedrig-divergenten Laser (Strahldivergenz:  $1,2 \times 1,7 \text{ mrad}$ ) mit einer maximalen Repetitionsrate von 20 Hz. Die Emissionswellenlänge beträgt 337,1 nm, die Pulsdauer 800 ps und die Pulsstärke kann von ca.  $120 \mu\text{J}$ – $160 \mu\text{J}$  ( $\pm 2,5\%$ ) variiert werden. Die Charakterisierung des Strahlprofils am Resonatorausgang mittels *beam-profiler* (siehe Kapitel 4.3, S.72) ergab in x-Richtung  $\bar{x} = 2,75 \text{ mm} \pm 0,05 \text{ mm}$  und in y-Richtung  $\bar{y} = 2,80 \text{ mm} \pm 0,07 \text{ mm}$  als Strahlausdehnung (siehe Abb.4.4, S.70). Der Laser wird über eine serielle Schnittstelle eines PCs und speziellem RS232-Interface des Herstellers gesteuert. Das Interface wandelt die PC Signale in optische Signale um, die über zwei Lichtleiter (Eingang, Ausgang) auf den Laser übertragen werden. Dazu wurde die Steuersoftware WinLac (Version 7.03) verwendet, die zusätzlich einen internen Energiemonitor des Lasers anzeigt. Der Laser kann in unterschiedlichen Betriebsmodi u.a. extern getriggert betrieben werden. Die externe Triggerung erfolgt optisch (Lichtleiter) durch einen USB-Controller (siehe Kapitel 5.1.7.1, S.114). Der LTB Laser besitzt eine offene Laserkartusche. Die Kartusche wird permanent mit Stickstoff (Qualität: 4.6 oder besser; 2,5 bar  $\text{N}_2$  Druck) gespült, so dass der Laser einen Stundenverbrauch von etwa 6 Liter Gas aufweist.

#### 4.2.2 Dielektrischer, variabler Abschwächer

Um die Laserenergie deposition auf der Probe innerhalb eines größeren Bereiches variabel regulieren zu können werden statische und ein variabler Abschwächer kombiniert verwendet. Der variable Abschwächer besteht aus zwei im Strahlengang des Lasers befindlichen, drehbaren Suprasil scheiben (LO Laser Optik). Die erste der beiden Scheiben ist dielektrisch beschichtet, die zweite unbeschichtete Scheibe kompensiert den Strahlversatz an der ersten Scheibe. Die dielektrische Beschichtung der ersten Scheibe verursacht eine winkelabhängige Reflektion des auftreffenden Laserstrahls. Die winkelabhängige Reflektion verläuft nicht-linear (siehe Abb.4.5, S.71). Die Justierung der beiden Scheiben wird über einen Schrittmotor und das Steuerprogramm MCP (siehe Kapitel 5.1.7.2, S.114) gewährleistet. Die Position wird in Schritten (engl.: *steps*) ange-

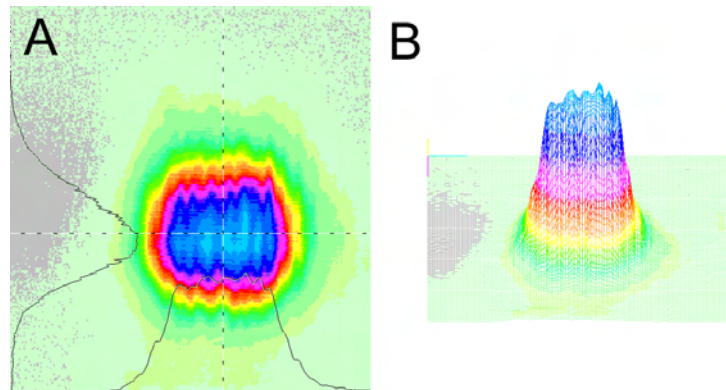


Abbildung 4.4: *Beam-profile* Originallaserstrahl (MNL 202-LD)

*Beam-profiler* Aufnahme des Originallaserstrahls des LTB MNL 202-LD im Testaufbau. (A) 2-D Ansicht, (B) 3-D Ansicht. Größe des Laserstrahls am Resonatorausgang: x-Richtung  $\bar{x} = 2,75 \text{ mm} \pm 0,05 \text{ mm}$ , y-Richtung  $\bar{y} = 2,80 \text{ mm} \pm 0,07 \text{ mm}$ ;  $n = 100$  Laserpulse (modifiziert nach Günther, 2007).

geben, die wiederum einem Winkel (0 steps =  $90^\circ$ , 160 steps =  $45^\circ$ ) zur optischen Achse entsprechen. Die Steuerung erfordert neben dem USB-Controller (siehe Kapitel 5.1.7.1, S.114) zusätzlich eine Verstärkerendstufe, die den Schrittmotor mit ausreichend Strom versorgt.

#### 4.2.3 Statische Abschwächer

Zur statischen Abschwächung wurden Bandpassfarbfilter (Schott Glas) und Neutralfilter (Linos Photonics) verwendet. Die folgende Tabelle 4.3 (S.72) gibt eine Übersicht der verwendeten Filter:

#### 4.2.4 Elektrostatische Ionenblende

Im Modul 2 der neuen AP-SMALDI Ionenquelle wurde eine elektrostatische Ionenblende verwendet. Die Ionenblende wurde aus Edelstahl gefertigt, weist eine Kleeblattform auf und besitzt eine zentrale Bohrung von 2,2 mm Durchmesser.

#### 4.2.5 x,y,z-Probenverfahrsystem

Das x,y,z-Probenverfahrsystem zur Positionierung der Probe befindet sich im Modul 3. Es besteht aus einer Zusammenstellung unterschiedlicher Komponenten und ist bei der Firma ficonTEC GmbH (ficonTEC alignment solutions GmbH, 2003) erhältlich. Die Achsen (Typ MM-3M-F, NAI Motion Control) des Verfahrsystems werden durch Servomotoren angetrieben und durch einen Achsverstärker MC-4SA mit Strom versorgt. Die Kontrolle des Achsverstärkers



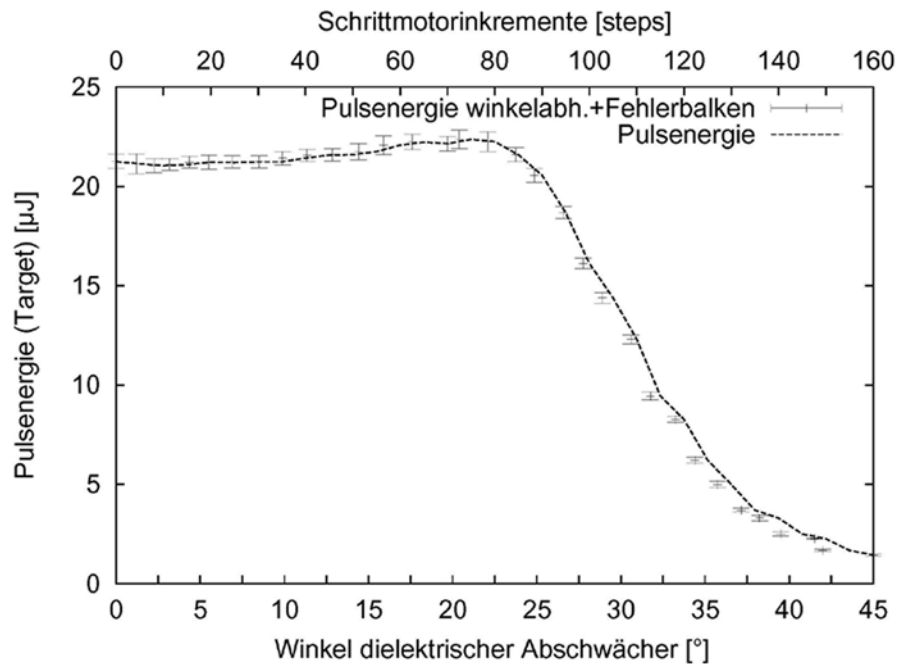


Abbildung 4.5: Laserenergiekennkurve im Probenbereich (AP-SMALDI Aufbau)

Verlauf der Laserpulsenergie auf der Probenoberfläche im installierten AP-SMALDI Aufbau. Auftragung mit doppelter x-Achse: untere x-Achse = Winkel des dielektrischen Abschwächers, obere x-Achse = Schrittmotorschritte (engl.: *steps*), y-Achse = Laserpulsenergie ( $\mu\text{J}$ ) ( $n = 20$ ).

findet über eine PCI Karte (NI-PCI 7344, National Instruments) in einem Steuer PC statt. Über eine 64:1 Übersetzung im Servoantrieb erreichen die Achsen eine Verfahrengenauigkeit von  $1,5 \mu\text{m}/2,54 \text{ cm}$ . Die Geschwindigkeit wird dabei in [steps/sec.] definiert ( $\text{step} \approx 0,12406 \mu\text{m}$ ). Bei alternierenden Bewegungen kann eine Anti-Hysteresefunktion genutzt werden. Jede Achse weist insgesamt 50 mm Verfahrensweg auf. Die Kontrolle des Verfahrensystems wurde in eine institutseigene Software (MCP; siehe Kapitel 5.1.7.2, S.114) implementiert.

### 4.3 Laserenergiemessung und Laserstrahl-Charakterisierung (*beam profiling*)

Laserenergiemessungen wurden mit einem pyroelektrischen Messkopf (Typ: J10MB-LE) der Firma Coherent GmbH vorgenommen (messbarer Spektralbereich: 190-1200 nm, Empfindlichkeitsbereich: 300 nJ-600  $\mu\text{J}$ ). Der Messkopf wurde an ein mobiles Messgerät (FieldMaxII-TOP, Coherent GmbH) angeschlossen. Das Messgerät kann über eine USB-Schnittstelle mit einem PC

Tabelle 4.3: STATISCHE ABSCHWÄCHER (LASERENERGIEMINDERUNG)

Spezifikation der zur Laserenergieminderung verwendeten statischen Abschwächer.

Filter	Spezifikation	Hersteller
Farbfilter BG 7	UV Transmission $\lambda = 337,1 \text{ nm}$ 4,4 %	Schott Glas
Farbfilter BG 18	UV Transmission $\lambda = 337,1 \text{ nm}$ 23,9 %	Schott Glas
Farbfilter BG 23	UV Transmission $\lambda = 337,1 \text{ nm}$ 35,7 %	Schott Glas
Farbfilter BG 28	UV Transmission $\lambda = 337,1 \text{ nm}$ 11,6 %	Schott Glas
Neutralfilter	UV Transmission $\lambda = 337,1 \text{ nm}$ 1 %	Linos Photonics
Neutralfilter	UV Transmission $\lambda = 337,1 \text{ nm}$ 10 %	Linos Photonics

gekoppelt und so gesteuert bzw. ausgelesen werden (Coherent Inc., 2005).

Zur Vermessung und Beobachtung der unterschiedlichen Strahlprofile wurde ein spezieller, durch Frau Sabine Günther entwickelter, Kameraaufbau verwendet (Günther, 2007). Der Aufbau des *beam profiling* Systems umfasst neben einem UV durchlässigen 32-fach vergrößernden Mikroskopobjektiv (Carl Zeiss AG) und einer CCD Kamera (Cohu Inc., Eletronics Division) auch PC Software (LBA-7XXPC) und eine Videoschnittstellen-PCI-karte der Firma Spiricon GmbH. Der Empfindlichkeitsbereich des Kamerasensors liegt zwischen 0,01 und 3 nJ/cm<sup>2</sup>.

#### 4.4 Probenräger

**Basisprobenräger:** Zur Senkung der mechanischen Belastung des x,y,z-Probenverfahrensystems wurden spezielle Aluminiumprobenräger gefertigt (siehe Abb.4.6, S.73). Die Probenräger wurden galvanisch hartvergoldet (Fa. Gierich).

Auf die Basisprobenräger können zusätzlich weitere Probensubstrate z.B. Silizium Wafer aufgebracht werden. Dies wurde mittels leitfähiger Graphitauf-

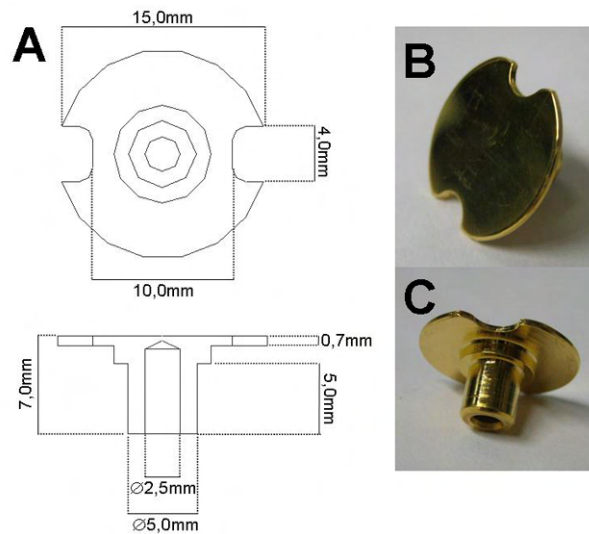


Abbildung 4.6: Basisprobenträger (Schemazeichnung, Foto)

(A) Basisprobenträger (Aluminium, hartvergoldet). (B und C) Fotografien von schräg-oben und schräg-unten.

kleber (Artikel G3347, Leit-Tabs 12 mm Ø; Plano GmbH) und Leitsilberkontaktierung erzielt.

**Zellkultursubstrate:** Zellen meiden metallische Oberflächen, jedoch können Silizium Wafer als Substrat verwendet werden. Die Wafer sind 50 mm Ø groß mit einer Dicke von  $\approx 0,5$  mm und weisen eine glatte und eine raue Seite auf. Um Zelladhäsion zu erzielen muss die glatte Seite der Silizium Wafer (Bruchstücke) verwendet werden. Dies wurde experimentell herausgefunden.

**Geätzte Silizium Wafer:** Der verwendete geätzte Silizium Wafer ist  $\approx 15 \times 15$  mm groß und weist, als Oberflächenrelief, „Sägezahn“-ähnliche Vertiefungen (klein, zackenförmig) auf. Die Zacken sind maximal  $205 \mu\text{m}$  lang und an der Basis etwa  $60 \mu\text{m}$  breit. Die Zacken weisen schräg abfallende Wände auf und hängen an der Basis verbunden, so dass sich eine kontinuierliche Zahnreihe ergibt. Dieses Probensubstrat wird im Folgenden als „Sägezahn-target“ bezeichnet.

**Edelstahlsubstrate:** Die Edelstahlsubstrate, aus handelsüblichem Edelstahl (Maße:  $43 \times 43 \times 0,6$  mm), wurden als Substrat zum Drucken der Biomolekülmuster benutzt (siehe Kapitel 4.8.3, S.78). Nach dem Bedrucken wurden die Edelstahlsubstrate in kleine Stücke ( $\approx 10$  mm Kantenlänge) geschnitten, aufgeklebt und untersucht.

## 4.5 Datenakquisition und Bilderstellung (*imaging*)

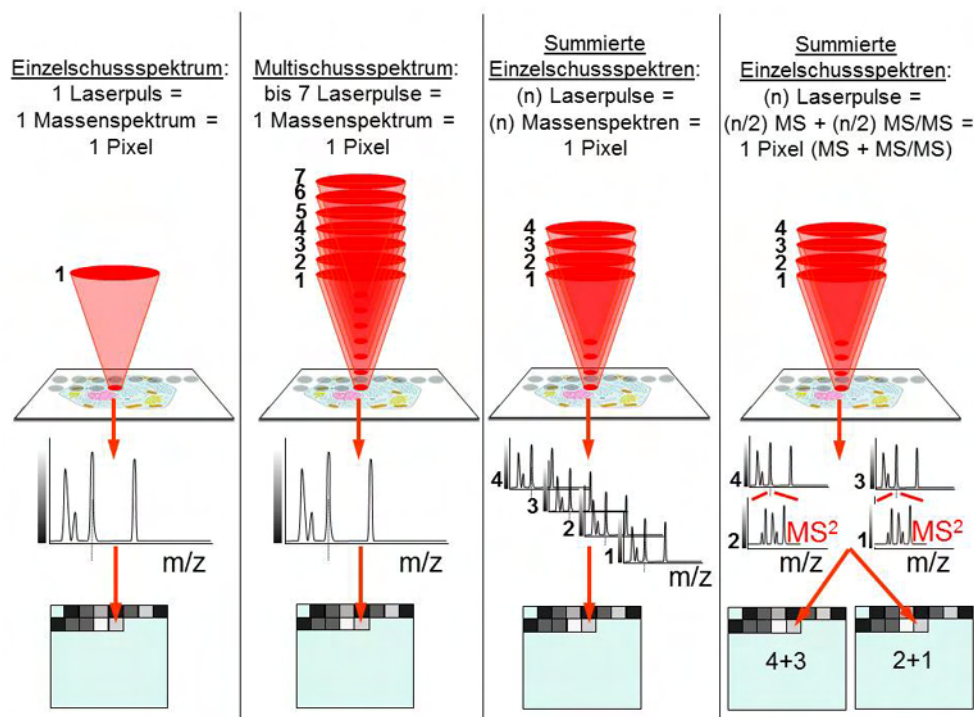
Die Ionenquelle ermöglicht es, zur Akquisition massenspektrometrischer Daten, eine unterschiedliche Anzahl von Laserpulsen pro Probenposition und Spektrum abzugeben. Folgende Modi sind möglich:

1. Einzelschussspektren: ein Laserpuls auf eine Probenposition generiert ein  $MS^1$  oder  $MS^2$  Spektrum.
2. Mehrere Einzelschussspektren: mehrere Laserpulse pro Probenposition generieren mehrere  $MS^1$  und/oder  $MS^2$  Einzelschussspektren.
3. Multischussspektren: maximal 7 Laserpulse pro Probenposition generieren ein  $MS^1$  oder  $MS^2$  Spektrum (alle erzeugten Ionen werden gesammelt)

Sollen im Modus 2 automatisch  $MS^1$  und  $MS^2$  Spektren erzeugt werden, muss eine *instrument method* in Xcalibur geschrieben und gestartet werden (Thermo Fisher Scientific, 2009). Obwohl eine vorgefertigte Instrumentenmethode abläuft kann die Laserpulsenergie und damit auch die Eindringtiefe reguliert werden (siehe Kapitel 3.3, S.18 und 4.2.2, S.69). Die IT des LTQ MS beträgt 450 ms (Einzelschussspektren) bis maximal 650 ms (Multischussspektren). Die Steuersoftware MCP wurde so modifiziert, dass der Modus unter Punkt 2 ausgeführt werden kann (siehe Kapitel 5.1.7.2, S.114). Zusätzlich wurde Mirion modifiziert, um die Einzelschussspektren einer Probenposition selektiv zur Bilderzeugung summieren zu können (siehe Kapitel 4.5, S.74).

Eine Übersicht über die möglichen Betriebsmodi wird in Abbildung 4.7 (S.75) gegeben. Zur Vereinfachung der Abbildung wird hier nicht die Möglichkeit zu  $MS^2$  Spektren bei den Modi „Einzelschussspektrum“ und „Multischussspektrum“ gezeigt.

Zur Erstellung massenspektrometrischer Verteilungsbilder (engl.: *images*) aus LTQ-FT MS Daten wurde innerhalb der Arbeitsgruppe die Software Mirion entwickelt. Mirion benötigt zum Lesen der MS Daten ein plugin des Herstellers. Dieses plugin orientiert sich an der jeweiligen Xcalibur Version des MS. Mit Mirion können Verteilungsbilder beliebiger, detektierter Massensignale erzeugt und bearbeitet werden. Mirion bietet hierzu verschiedene Routinen zur Bildbearbeitung (Überlagerung, Färbung, Referenzbild, *image*). Um ein Image erzeugen zu können, muss eine „\*.udf“ Datei vorliegen, in der die notwendigen Basisdaten enthalten sind (Pixelanzahl, Pixelgröße, Name der „\*.raw“ Datei (MS Quelldatei), usw.). Die \*.udf Datei wird automatisch vom MCP nach Abschluss einer rasternden Untersuchung erstellt. Damit Mirion die \*.raw

Abbildung 4.7: *Imaging* Betriebsmodi

Zur Datenakquisition mit der neuen AP-SMALDI Ionenquelle stehen vier Betriebsmodi zur Verfügung, bei denen die **Desorption jeweils an der gleichen Probenposition = gleiches Pixel** stattfindet. (A) Einzelschusspektren: Ein Laserpuls auf eine Probenposition, ein Spektrum entsteht. (B) Multischusspektren: Max. 7 Laserpulse pro Probenposition (alle entstehenden Ionen werden gesammelt), ein Spektrum entsteht. (C) n Laserpulse pro Probenposition, n Einzelschusspektren entstehen (Summierung in Mirion). (D) n Laserpulse pro Probenposition, n Einzelschusspektren (MS¹ und/oder MS²) entstehen (benötigt *instrument method*, (Thermo Fisher Scientific, 2009)). Spektren können nachfolgend in Mirion zur Bilderstellung selektiv summiert werden.

Daten (\*.raw Dateien, maximale Größe: 1,8GB) bearbeiten kann, müssen diese sich im Verzeichnis der zugehörigen \*.udf Datei befinden. Mirion (Version: V3\_multishot5, Einteilung durch den Autor) unterstützt die Bilderstellung aus allen o.g. Betriebsmodi. Frühere Mirion Versionen sind lediglich in der Lage Einzelschusspektren zu verarbeiten (Näheres siehe Hester et al., 2005 und Arne Leisner, 2005). Zur Bedienung der Multishot Mirion Version gilt vor allem die online Hilfe.

## 4.6 Ergänzende Software

Berechnungen theoretischer Molekül- oder Ionenmassen wurden mit dem *Molecular Weight Calculator* (Version 6.45) von Matthew Monroe durchgeführt. Zur

Berechnung theoretischer Fragmentierungsmuster wurde ebenfalls dieses Programm benutzt. Zur Durchführung theoretischer Verdaue von Peptiden wurde die Software *Protein Prospector* (<http://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm>) in der Version 5.3.2 benutzt. Graphen und Näherungsfunktionen wurden mit Hilfe von Gnuplot (Version 4.2.5) erzeugt.

## 4.7 Mikroskope

Zur mikroskopischen Dokumentation (SMALDI Proben, Präparationen, Zellkultur) standen zwei Mikroskope zur Verfügung: ein Olympus BX41 Mikroskop (Olympus Life Science Europa GmbH) und ein Hund WILOVERT Standard Mikroskop (Helmut Hund GmbH).

Das Olympus BX 41 Mikroskop besitzt eine herkömmliche Objektivanordnung mit einem 5-fach, 10-fach, 40-fach und 100-fach vergrößernden Objektiv. Das 100-fach Objektiv kann ohne Immersionsöl betrieben werden. Die Beleuchtung des Objektes wird durch eine VIS- und UV-Aufflichteinheit, sowie eine VIS-Durchlichteinheit gewährleistet. Das Aufflichtfluoreszenzsystem besteht aus einer Quecksilber“-dampfampe (U-LH100HG), die durch ein Netzteil (U-RFLT) versorgt wird und insgesamt vier Filterkombinationen. Von diesen vier Filterkombinationen wurden fast ausschließlich System 1 (U-MWU2, UV *wide band*) und System 2 (U-MNU2, UV *narrow band*) benutzt. Beide Filterkombinationen regen mit recht ähnlicher Wellenlänge an unterscheiden sich jedoch im Transmissionsbereich der Filter für das reemittierte Probenlicht. Die VIS-Aufflichtbeleuchtung wird durch eine Halogenlampe (U-LH100L-3) gewährleistet, die durch ein separates Netzteil (TH4-200) versorgt wird. Die Probe kann über eine vorhandene Farb-CCD-Kamera (CC-12) dokumentiert werden. Eine umfangreiche Bediensoftware (SIS, Soft Imaging System; Olympus Soft Imaging Solutions GmbH; Version 3.2) ermöglicht die digitale Vermessung der Probe.

Das WILOVERT Standard Mikroskop besitzt einen inversen Objektivrevolver mit einem 4-fach, einem 10-fach Phasenkontrast (PhaKo) und einem 40-fach PhaKo Objektiv. Das Mikroskop wird in der Zellkultur eingesetzt. Die VIS-Probenbeleuchtung erfolgt durch eine Halogenlampe. Ein zusätzlicher Fototubus ermöglicht das Anbringen einer Digitalkamera zur Dokumentation der Proben, hier eine Sony Cyber-shot (DSC-F717; 5 Megapixel).

## 4.8 Artificielle Proben

Als artificielle Proben wurden Farbstofffilme (LDI) und Biomoleküle ((S)MALDI) untersucht. Zu den untersuchten Biomolekülen zählen Saccharide,

Lipide/Lipidgemische und Peptide/Peptidgemische. Die Biomoleküle wurden mittels Standard *dried droplet* Präparation klassisch mit Matrix, mit Zellpuffer oder mittels eines Bioprinters (Chip, Chemical Inkjet Printer; Shimadzu Europe GmbH) aufgetragen. Als Substrat dienten Standard MALDI Probenträger oder strukturierte Silizium Wafer. Im Falle der Standard Probenträger wurde ggfs. noch ein zusätzliches Strukturelement (z.B. TEM Gitter) hinzugefügt und mit Leitsilber kontaktiert.

#### 4.8.1 Farbstofffilm (LDI)

Die Farbstofffilme zur LDI Untersuchung wurden einschichtig mittels Filzfaser-schreiber (Edding™) aufgetragen (siehe Kapitel 5.1.4, S.107). Als Hauptkomponente des Farbstoffes tritt in den Massenspektren Rhodamin 6G (Ethyl 2-(6-(ethylamino)-3-(ethylimino)-2,7-dimethyl-3H-xanthen-9-yl)benzoat-Monohydrochlorid; 478,2 Da) auf. Rhodamin 6G erscheint als Massensignal bei  $m/z$  443,23237Da und  $m/z$  415,20138Da auf (FT Messungen, voreingestellte Massenauflösung: 100000). Das höhere der beiden Massensignale ergibt sich durch Verlust des  $\text{Cl}^-$ -Ions, das niedrigere durch den zusätzlichen Verlust von  $\text{C}_2\text{H}_4$ . Die LDI Proben wurden benutzt, um anhand der im Farbstoff erzeugten Brennflecken ( $\approx$  Desorptions-Laserfokusbereich) experimentell folgende Parameter zu bestimmen:

1. Den benötigten Desorptions-Laserfokusbereich, um ein Minimalsignal in der LTQ (absolute Minimum) zu erreichen.
2. Den benötigten Desorptions-Laserfokusbereich, um ein ausreichendes Massensignal in der LTQ in jedem Spektrum (Minimalgröße für ausreichendes Signal-Rausch-Verhältnis (engl.: *signal* = *s*, *noise* = *n*) Verhältnis in der LTQ) zu gewährleisten und
3. Den benötigten Desorptions-Laserfokusbereich, um ein ausreichendes Signal im FT-ICR in jedem Spektrum (Minimalgröße für ausreichendes  $s/n$  Verhältnis im FT-ICR) zu gewährleisten.

Die Vermessung der Brennflecken erfolgte mit dem Olympus BX41 Mikroskop.

#### 4.8.2 Strukturierte artifizielle Oberflächen

##### 4.8.2.1 LDI Proben

Zur Strukturierung der LDI Probe wurde ein feines Metallgitter verwendet. Die lichte Weite beträgt  $320\text{ }\mu\text{m}$ , die Stegbreite  $40\text{ }\mu\text{m}$ . Das Gitter wurde über dem

Farbstofffilm positioniert und mit Leitsilber elektrisch kontaktiert.

#### 4.8.2.2 SMALDI Proben

Biomolekulare Proben wurden durch ein feines, metallisches TEM-Gitter ( $50\text{ }\mu\text{m}$  lichte Weite,  $13\text{ }\mu\text{m}$  Stegbreite) strukturiert. Das Gitter wurde durch Leitsilber elektrisch kontaktiert. Ein derartiges Gitter wurde, sowohl über *pre-mixed* Standard MALDI *dried droplet* Präparationen als auch auf *pre-mixed* Zellpuffer *dried droplet* Präparationen präpariert (Näheres siehe 4.11, S.85).

Geätzte Silizium Wafer (siehe 4.4, S.73) wurden mit biomolekularen Lösungen präpariert. Die Präparation dieser extrem hydrophoben Oberflächen gelang in einer für MALDI *imaging* ausreichenden Qualität ausschließlich mit der *pre-mixed* Zellpuffer *dried droplet* Methode (näheres siehe 4.11.3, S.87).

#### 4.8.3 „Bioprinted Molecules“ – Gedruckte Biomolekülmuster

Durch Verwendung des Shimadzu CHIP (engl.: *chemical inkjet printer*) Druckers konnten unterschiedliche Biomoleküle auf Edelstahlsubstrate gedruckt werden (siehe Kapitel 4.4, S.72). Dabei wurde jeweils ein  $5\times 5$  Feld aus Druckpunkten eines Peptidgemisches (zwei Konzentrationen) und eines Lipidgemisches erzeugt. Die beiden Konzentrationsstufen des Peptidgemisches wurden durch den Druck von je 5 nL Lösung pro Druckpunkt bzw.  $4\times 5$  nL (= 20 nL) Lösung pro Druckpunkt erzeugt. Beim Lipidgemisch wurden 20 nL pro Druckpunkt verwendet. Der Abstand der Druckpunkte im  $5\times 5$  Feld zueinander beträgt  $300\text{ }\mu\text{m}$  bei den Peptiden und  $400\text{ }\mu\text{m}$  bei den Lipiden. Das Peptidgemisch besteht aus Bradykinin [1-5], Angiotensin 2, Neurotensin, ACTH [18-39] und bovinem Insulin B-Kette. Im Lipidgemisch befinden sich Phosphatidylcholin 34:1 und Cholesterin. Die Peptide wurde in 30 % Acetonitril/70 % Wasser mit 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA), die Lipide in 100 % Methanol mit 0,1 % TFA gelöst. Die Arbeiten wurden am FOM-AMOLF in Amsterdam (Niederlande) durchgeführt. Die gedruckten Probenfelder wurden im Institut zusätzlich einmal mit  $100\text{ }\mu\text{l}$  25 mg/mL 2,5-DHB in 50 % Ethanol/50 % Wasser mit 0,1 % TFA (*pneumatic assisted spray*, Airspray) besprüht (siehe Kapitel 4.10.1, S.83). In Tabelle 4.4 (S.79) sind die verwendeten Komponenten und ihre Konzentration detailliert aufgeführt. Aufgrund des Massenbereiches von  $m/z$  150-2000Da konnten beim Peptidgemisch nur drei Komponenten (Bradykinin [1-5], Angiotensin 2, Neurotensin) analysiert werden.



Tabelle 4.4: BIOMOLEKÜLGEMISCHE (PEPTIDE, LIPIDE) FÜR DAS „BIOPRINTING“

Gedruckte Substanzen und Lösungsmittel. Die Peptide wurden in 30 % Acetonitril + 70 % Wasser + 0,1 % TFA zusammen mit 5 mg/ml 2,5-DHB, die Lipide in 100 % Methanol + 0,1 % TFA zusammen mit 5 mg/ml 2,5-DHB gelöst. (SLC = Single Letter Code)

Substanz	Summenformel	Monoisotopische Masse (Ladung)	Konzentration
<b>Peptide</b>			
Bradykinin [1-5] (SLC: RPPGF)	C <sub>27</sub> H <sub>40</sub> N <sub>8</sub> O <sub>6</sub>	573,3149 (+1)	2 × 10 <sup>-6</sup> mol/L
Angiotensin 2 (SLC: DRVYIHPF)	C <sub>50</sub> H <sub>71</sub> N <sub>13</sub> O <sub>12</sub>	1046,5423 (+1)	1,2 × 10 <sup>-6</sup> mol/L
Neurotensin (SLC: pyrELYENK-PRRPYIL)	C <sub>78</sub> H <sub>122</sub> N <sub>21</sub> O <sub>20</sub>	1672,9175 (+1)	0,8 × 10 <sup>-6</sup> mol/L
ACTH [18-39] (SLC: RPVKVY-PNGAEDES-AEAFPLEF)	C <sub>112</sub> H <sub>165</sub> N <sub>27</sub> O <sub>36</sub>	2465,1988 (+1)	1 × 10 <sup>-6</sup> mol/L
Bovines Insulin B-Kette (SLC: FVNQHL-CGSHLVEA-LYLVCGER-GFFYTPKA)	C <sub>157</sub> H <sub>232</sub> N <sub>40</sub> O <sub>41</sub> S <sub>2</sub>	3398,6818 (+1)	5 × 10 <sup>-6</sup> mol/L
<b>Lipide</b>			
Cholesterin	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O	386,3549	2,6 × 10 <sup>-3</sup> mol/L
Phosphatidylcholin 34:1	C <sub>42</sub> H <sub>83</sub> NO <sub>8</sub> P	760,5856	1,3 × 10 <sup>-3</sup> mol/L

## 4.9 Probengewinnung (biologische Proben)

Als biologische Proben wurden Zellen und Gewebe untersucht. Bei den Zellen handelt es sich um permanente humane Zelllinien, die Gewebe stammen von Maus und Ratte aus unterschiedlichen Organen (Zunge, Wange, Oberschenkel, Hirn). Hierbei wurde auch durch *Trichinella spiralis* kontaminiertes Rattengewebe verwendet. Bei *T. spiralis* handelt es sich um einen parasitisch lebenden Fadenwurm (Nematode). Ein verkapseltes Larvalstadium des Fadenwurms verursacht die bekannten Muskeltrichinen, eine mikroskopisch gut erkennbare Veränderung im Wirtsgewebe. Der Verzehr von mit Muskeltrichinen kontami-

niertem Fleisch führt zur Infektion des Konsumenten.

#### 4.9.1 Zellproben

Als permanente Zelllinien wurden HeLa, LOVO, SK-HEP-1, 8305C, A-498 und VA-ES-BJ Zellen kultiviert. Die Auswahl der Zelllinien erfolgte nach dem Stand bisheriger Informationen, der Gewebeherkunft sowie der Zellgröße. Die Zelllinien wurden experimentell auf ihre Adaptierbarkeit an serumfreie Zellkulturbedingungen überprüft. Obwohl es sich hierbei um Ergebnisse dieser Arbeit handelt werden diese, im Sinne des inhaltlichen Zusammenhangs, in diesem Kapitel aufgeführt (siehe Kapitel 5.5.1, S.142 und Tabelle 4.5, S.82).

Massenspektrometrisch untersucht wurden hauptsächlich zwei Zelllinien, HeLa (Cervix Carcinom) und 8305C (Schilddrüsen Carcinom). Die Zellen wurden, soweit möglich, ohne Antibiotika kultiviert. Alle Zelllinien wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) bezogen (HeLa, DSMZ Nr. ACC 57; A-498, DSMZ Nr. ACC 55; VA-ES-BJ, DSMZ Nr. ACC 328; SK-HEP-1, DSMZ Nr. ACC 141; LOVO, DSMZ Nr. ACC 350; 8305C, DSMZ Nr. ACC 133).

Die Kultivierung erfolgte in 100 mm Ø Zellkulturschalen (Labomedic Laborversand) bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 100 % relativer Luftfeuchte (Zellkulturschrank: Sanyo MCO-18AIC). Die Zellen wurden zweimal wöchentlich subkultiviert. Die Splitfaktoren wurden so angepaßt, dass bei zweimaliger Subkultivierung jeweils konfluentes Zellwachstum in der Schale erzielt wurde. Die Zellen wurden zur Subkultivierung mit jeweils 5ml DPBS Puffer (PAA, Marburg) gewaschen und mit 1ml Trypsin-EDTA Lösung (PAA, Marburg) abgelöst. Nach Ablösung der Zellen wurde die Aktivität des Trypsins durch Zugabe von 4ml Frischmedium gestoppt. Die Zellsuspension wurde in konische Kunststoff-Zentrifugenröhrchen (Art. N459.1, Carl Roth) pipettiert und auf Stufe 4 in einer Hettich Tischzentrifuge (EBA III, Typ 2008) für etwa 60Sek. abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und mit 5ml Frischmedium resuspendiert. Aus dieser Suspension wurde dem Splitfaktor entsprechend Lösung entnommen und mit weiterem Frischmedium, in der neuen Zellkulturschale, aufgefüllt (z.B. 1:10 entspricht 9ml Frischmedium + 1ml Resuspensat).

Als Medium wurde entweder konventionelles Zellkulturmedium (alle mit 10 % FCS Gold) oder das jeweils ermittelte serumfreie Medium verwendet. Die konventionellen Medien wurde ggfs. supplementiert (nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA), Langzeit-L-Glutamin). Die durchschnittliche Größe (Länge × Breite) der Zellen beträgt (n = 6 bis 9):

- HeLa  $55 \times 15 \mu\text{m} \pm 5 \times 3 \mu\text{m}$  (große Zellen:  $80 \times 20 \mu\text{m}$ ),

- A-498  $55 \times 20 \mu\text{m} \pm 2 \times 4 \mu\text{m}$  (große Zellen:  $60 \times 45 \mu\text{m}$ ),
- VA-ES-BJ  $60 \times 40 \mu\text{m} \pm 12 \times 8 \mu\text{m}$  (große Zellen:  $120 \times 40 \mu\text{m}$ ),
- 8305C  $60 \times 23 \mu\text{m} \pm 10 \times 7 \mu\text{m}$  (große Zellen:  $130 \times 60 \mu\text{m}$ ),
- SK-HEP-1  $55 \times 12 \mu\text{m} \pm 8 \times 2 \mu\text{m}$  (große Zellen:  $85 \times 20 \mu\text{m}$ ) und
- LOVO  $34 \times 14 \mu\text{m} \pm 4 \times 1 \mu\text{m}$ .

Die Zellkulturarbeiten fanden in einer Kojair Sicherheitswerkbank (Modell: KR130, Klasse: 2A) statt. Alle Lösungen wurden vor Gebrauch stets eine Stunde auf  $37^\circ\text{C}$  im Wasserbad temperiert.

Zur SMALDI Untersuchung wurden die Zellen auf Bruchstücken runder Silizium-Wafer (siehe 4.4, S.72) als Wachstumssubstrat kultiviert. Dazu wurden die Bruchstücke sterilisiert (50 % Ethanol), mit der glatten Seite nach oben in die Zellkulturschalen gegeben und schließlich die Zellen darüber ausgesäht. Die Bruchstücke wiesen jeweils  $\approx 8$  mm Kantenlänge auf. Nach dem Aufwachsen der Zellen wurden die Wafer-Bruchstücke, wie bereits beschrieben, präpariert.

#### 4.9.2 Gewebeproben

Zur Gewinnung tierischer Gewebeproben standen während des Dissertationszeitraumes zwei Arten zu Verfügung: Ratte (*Rattus rattus*) und Maus (*Mus musculus*). Es wurden dabei jeweils adulte Tiere verwendet. Über eine Kooperation mit der Veterinärmedizin (Parasitologie) konnte durch *Trichinella spiralis* (Muskeltrichine) kontaminiertes Rattengewebe, durch eine Kooperation mit der Humanmedizin (Anatomie und Zellbiologie) konnte Mausgewebe bezogen werden. In beiden Instituten wurden die Tiere nach Betäubung durch Enthauptung getötet. Die Tiere wurden anschließend präpariert und die zu untersuchenden Gewebe, in Alufolie eingeschlagen, in  $\text{N}_2\text{liq.}$  schockgefroren. Von den Ratten wurde insbesondere die quergestreifte Skelettmuskulatur wie Oberschenkel, Zunge und Wange, von den Mäusen Hirn und Oberschenkel präpariert. Die weitere Aufbewahrung der schockgefrorenen Präparate erfolgte bei  $-80^\circ\text{C}$ . Die Gewebestücke wurden mittels eines Kryomikrotoms (Leica CM 1900) bei  $-18^\circ\text{C}$  dünn geschnitten ( $15\text{--}20 \mu\text{m}$  Schnittstärke). Die Gewebestücke wurden dazu auf dem Schneidehalter ausschließlich an ihrer Basis fixiert (Tissue Tek (Sakura Finetek) beim Rattengewebe, 10 %ige Saccharoselösung beim Mausgewebe). Das Kryotommesser hatte also ausschließlich mit dem Gewebe Kontakt. Die Dünnschnitte wurden mit einem gereinigten oder neuen Kryotommesser angefertigt. Schnittkontaminationen durch Einbettmedien, wie z.B. Tissue Tek,

Tabelle 4.5: ZELLINIEN UND ZELLKULTURBEDINGUNGEN

Kultivierte Zelllinien, verwendete Zellkulturmedien und Bedingungen/Vorgehensweise zur Subkultivierung.

Zelllinie	Herkömmliche Zellkulturbedingungen		Serumfreie Zellkulturbedingungen	
	Medium	Splitfaktor	Medium	Splitfaktor
HeLa	MEM (oder Medium 199 m. Earle's Salts) + 10 % FCS + 1 % NEAA + 0,002 M L-Glutamin	1:10	Quantum 101, (PAA Laboratories), Carcinopan (PAN Biotech)	1:10
8305C	RPMI 1640 + 10 % FCS	1:3	PC-1 (Lonza)	1:5
SK-HEP-1	RPMI 1640 + 10 % FCS	1:4	PC-1 (Lonza)	1:5
LOVO	RPMI 1640 + 10 % FCS	1:8	PC-1 (Lonza)	1:5
A-498	DMEM m. high D-Glucose m. L-Glutamin + 10 % FCS + 1 % NEAA	1:10	PC-1 (Lonza)	1:8
VA-ES-BJ	DMEM m. high D-Glucose m. L-Glutamin + 10 % FCS + 1 % NEAA	1:10	PC-1 (Lonza)	1:8
	Verwendetes Kälberserum: FCS Gold, PAA Laboratories			

können zu extremer Signalsuppression der massenspektrometrischen Probensignale führen (Schwartz et al., 2003). Die Dünnschnitte wurden auf vergoldete Probenhalter oder ITO (Indium-Tin-Oxide) Objektträger nach der *freeze-thaw-mounting* Technik aufgezogen. Der Schnitt wird dabei zunächst auf den kalten Objektträger aufgebracht und anschließend über den Gefrierpunkt erwärmt. Der Schnitt schmilzt und zieht sich dabei plan auf das Substrat auf. Anschließend wurden die Schnitte auf Eis, dann bei -20°C bzw. länger bei -80°C gelagert.

## 4.10 Probenpräparation

Die Matrix (bei allen Versuchen ausschließlich 2,5-DHB) wurde mit zwei unterschiedlichen Verfahren, teilweise in Kombination, auf die Proben aufgebracht. Zum einen mit einem neuen, rein wässrigen Verfahren (Zellpuffer; siehe Kapitel 5.7.1, S.145), zum anderen mit dem schon etablierten *Pneumatic Assisted Spray (Airspray)* Verfahren. Da es sich bei der Formulierung der Zellpuffer um ein experimentelles Ergebnis handelt werden diese im Ergebnisteil im Kapitel 5.7.1.1 (S.148) näher behandelt. Trypsin (Roche) wurde in Tris-HCl (0,1 Mol; pH 8,5) oder Zellpuffer (pH 6,0) verdünnt (siehe Kapitel 4.10.3, S.84).

### 4.10.1 Pneumatic Assisted Spray (Airspray) Verfahren

Das *Airspray* Verfahren wurde von Werner Bouschen (Bouschen, 2004) in der Arbeitsgruppe etabliert und von Oliver M. Schulz weiterentwickelt. O. M. Schulz ergänzte den grundsätzlichen Aufbau durch eine Sprühkammer und die Möglichkeit, die Probe während des sprühens zu drehen (siehe Abb.4.8, S.84). Die Matrix wird in klassischer wässrig-organischer Lösung (mind. 50 % Lösungsmittel, Ethanol oder Aceton) und 0,1 % TFA gelöst und versprüht (Schwartz et al., 2003; Khatib-Shahidi et al., 2006; Lemaire et al., 2006; Groseclose et al., 2007; Taban et al., 2007).

Alle durchgeführten *Airspray*-Präparationen wurden ausschließlich mit 2,5-DHB als Matrix und Konzentrationen zwischen 10 und 25 mg/ml durchgeführt. Die Matrixlösung wird dabei über eine Mikroliterspritze (Volumen: 20  $\mu$ l) in einen unterstützenden N<sub>2</sub>-Gasstrom (1bar) versprüht. Die Spritze wird manuell über einen Zeitraum von  $\approx$  1Min. entleert. Der Probenteller dreht sich dabei mit  $\approx$  120U/Min.. Die Qualität der Matrixschicht wird mikroskopisch überprüft. Die Auswahl des organischen Lösungsmittels, die Konzentration der Matrix und die Handhabung der Spryanlage wurden von O. M. Schulz mündlich mitgeteilt.

### 4.10.2 Nutzung von Zellpuffer und *Airspray*

Die Benutzung des Zellpuffers ergab in den meisten Fällen eine feine und homogene Schicht von Matrixkristallen. In wenigen Fällen kristallisierte der Zellpuffer jedoch nicht vollständig aus. In diesen Fällen wurde nachträglich Matrix mittels *Airspray* aufgetragen, um Kristallisationskeime einzubringen und die weitere Kristallisation zu initiieren. Dies führte in den meisten Fällen zur vollständigen Kristallisation des Zellpuffers. Die Applikation des Zellpuffers wird in Kapitel 5.7.1.2 (S.148) beschrieben.

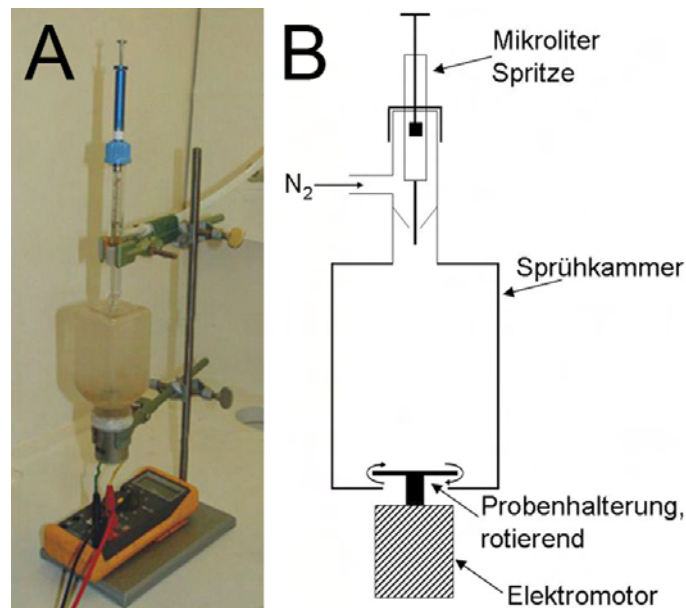


Abbildung 4.8: *Airspray* Apparatur (Foto, Schemazeichnung)

Foto (A) und Schemazeichnung (B) des *Pneumatic Assisted Spray (Airspray)* Aufbaus. Die Matrixlösung wird mit einer Mikroliterspritze (Volumen: 20  $\mu$ l, per Hand) innerhalb einer Minute in einen N<sub>2</sub>-Strom (1bar) versprüht. Der Probenteller rotiert mit etwa 120 U/Min.. Strom-/Spannungskontrolle am Elektromotor.

#### 4.10.3 Verwendung von Trypsin

Trypsin (Roche) wurde, den Angaben des Herstellers folgend, angesetzt (Roche Diagnostics GmbH, 2009). Das Lyophilisat (25  $\mu$ g) wird in 250  $\mu$ l 1 mM HCl gelöst (Konzentration: 0,1 g/L). Aus dieser Stammlösung können Aliquots entnommen und bei -20°C gelagert werden. Aus den Aliquots wird die fertige Arbeitslösung mit 10-50 mg/L Trypsin unmittelbar vor Gebrauch, durch eine 1:2 bis 1:10 Verdünnung mit 0,1 M Tris-HCl Puffer (pH 8,5), bereitet. Die Endkonzentration des Trypsins für den Proteinverdau soll 1/100 bis 1/20 der erwarteten Proteinmenge betragen (Massenverhältnis). Der Verdau wird in Lösung normalerweise 2-18 Stunden bei 37°C durchgeführt.

Zum Einsatz des Trypsins im Zellpuffer wurde zur Berechnung des Massenverhältnisses ein Proteinmolekulargewicht von durchschnittlich 2000Da und eine Proteinkonzentration von  $5 \cdot 10^{-6}$  mol/L angenommen ( $\approx$  0,01 g/L Protein). Bei einem 1:20 Massenverhältnis von Trypsin zur Probe müssen somit 0,005 g/L Trypsin zugegeben werden. Die Trypsin Stammlösung enthält 0,1 g/L Trypsin und muss deshalb 1:20 verdünnt werden. Die Trypsin Stammlösung wurde

zum Gebrauch im Zellpuffer 1:10 oder 1:20 verdünnt ( $\approx 2 \cdot 10^{-7}$  mol/L Trypsin). Die Trypsinkonzentration ist demzufolge maximal 2-fach überkonzentriert. Selbst bei autolytischem Verdau liegt die Trypsinkonzentration damit noch immer unterhalb der Nachweisgrenze des AP-SMALDI Aufbaus. Die Länge der Inkubation bei 37°C wurde variiert.

#### 4.11 Massenspektrometereinstellungen, Ionenquelleneinstellungen, Präparation (Scanning LDI (SLDI), MALDI, SMALDI)

Im Folgenden soll ein kurzer, aufzählender Überblick über die Einstellungen des Massenspektrometers und der Ionenquelle während der Untersuchungen gegeben werden. Zusätzlich wird kurz die Art der Präparation der jeweiligen Probe aufgeführt.

##### 4.11.1 LDI/SLDI

###### 30×30 Scan

- **Analyt (MW) und Präparation:** Roter Farbstoff (Rhodamin-6G-chlorid;  $m/z$  478,2 Da), Auftragung per Hand mittels Filzfaserschreiber, Strukturierung mittels Metallgitter 320  $\mu\text{m}$  lichte Weite, 40  $\mu\text{m}$  Stegbreite, Kontaktierung durch Leitsilber
- **Abgerasterter Bereich (voreingestellte Schrittweite):** 30×30 Pixel (60 steps/Pixel  $\approx 7,44 \mu\text{m}$  Pixelkantenlänge)
- **Verwendetes Massenspektrometer (Untersuchungsmethode), Öffnungszeit (IT), ggfs. voreingestellte Massenauflösung, Massenbereich ( $m/z$ ):** FT MS ( $\text{MS}^1$ ), IT 800 ms, 50000,  $m/z$  50-500 Da
- **Spektrientyp/Anzahl Spektren pro Pixel:** Einzelschussspektren/1
- **Software:** LTQTune 1.0, Xcalibur 1.4 SR 1
- **Ionenquelleneinstellungen (Laserpulsenergie, Potential Proben-teller und Ionenblende):** 2,8  $\mu\text{J}$ , 3 kV, 112 V

##### 4.11.2 MALDI

###### Hintergrundspektrum (Zellpuffer)

- **Analyt und Präparation:** Zellpuffer 1, *dried droplet* Präparation

- **Verwendetes Massenspektrometer (Untersuchungsmethode), Öffnungszeit (IT), ggfs. voreingestellte Massenauflösung, Massenbereich (m/z):** LTQ MS ( $MS^1$ ), IT 500 ms, m/z 150-2000 Da
- **Spektrrentyp/Anzahl Spektren pro Pixel:** Multischussspektren (6)/1
- **Software:** LTQTune 2.0, Xcalibur 2.0
- **Ionenquelleneinstellungen (Laserpulsenergie, Potential Proben-teller und Ionenblende):** Spektrum schwarz: 27 nJ, Spektrum blau: 37 nJ; 3 kV, 100 V

#### Signalqualität der Zellpufferspektren

- **Analyt(MW, Analytkonzentration) und Präparation:** Penta-Glycin (m/z 303,12 Da;  $1,9 \cdot 10^{-4}$  mol/L), Angiotensin II (m/z 1045,53 Da;  $1,8 \cdot 10^{-4}$  mol/L) und Substanz P (m/z 1347,71 Da;  $2,2 \cdot 10^{-4}$  mol/L), zunächst in  $H_2O$  dest. gelöst, verdünnt mit Zellpuffer 2. *dried droplet* Präparation
- **Verwendetes Massenspektrometer (Untersuchungsmethode), Öffnungszeit (IT), ggfs. voreingestellte Massenauflösung, Massenbereich (m/z):** LTQ MS ( $MS^1$ ), IT 650 ms, m/z 150-2000 Da
- **Spektrrentyp/Anzahl Spektren pro Pixel:** Einzelschussspektren/1
- **Software:** LTQTune 1.0, Xcalibur 2.0
- **Ionenquelleneinstellungen (Laserpulsenergie, Potential Proben-teller und Ionenblende):** 139 nJ, 2,8 kV, 313 V

#### Vergleich der Signalqualität und -intensität zwischen Zellpuffer- und Standard-MALDI-Spektren

- **Analyt(MW, Analytkonzentration) und Präparation:** Bradykinin 1-7 (m/z 756,39;  $2 \cdot 10^{-6}$  mol/L), Angiotensin II (m/z 1045,53 Da;  $2 \cdot 10^{-6}$  mol/L), zunächst in  $H_2O$  dest. gelöst, verdünnt mit Matrixlösung (10 mg/mL in 20 % Ethanol + 0,1 % TFA) und Zellpuffer 2. *dried droplet* Präparation
- **Verwendetes Massenspektrometer (Untersuchungsmethode), Öffnungszeit (IT), ggfs. voreingestellte Massenauflösung, Massenbereich (m/z):** LTQ MS ( $MS^1$ ), IT 600 ms, m/z 98-1100 Da (Standard DHB) und 600-1200 Da (Zellpuffer)
- **Spektrrentyp/Anzahl Spektren pro Pixel:** Einzelschussspektren/1



- **Software:** LTQTune 1.0, Xcalibur 2.0
- **Ionenquelleneinstellungen (Laserpulsenergie, Potential Proben-teller und Ionenblende):**  $1\text{ }\mu\text{J}$ , 2,8 kV, 150 V

#### 4.11.3 SMALDI – strukturierte artifizielle Oberflächen

##### 25×25 Scan

- **Analyt (MW, Analytkonzentration) und Präparation:** Bradykinin 1-7 ( $m/z$  756,39 Da;  $1,2 \cdot 10^{-6}$  mol/L), Angiotensin II ( $m/z$  1045,53 Da;  $1,2 \cdot 10^{-6}$  mol/L), in  $\text{H}_2\text{O}$  dest. gelöst, verdünnt mit Zellpuffer 2. *dried droplet* Präparation von  $10\text{ }\mu\text{l}$ , kurz angetrocknet (Fön), anschließend Trocknung für 1,5 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  (Trockenschrank), Strukturierung mittels TEM Gitter  $50\text{ }\mu\text{m}$  lichte Weite und  $13\text{ }\mu\text{m}$  Stegbreite, Kontaktierung durch Leitsilber
- **Abgerasterter Bereich (voreingestellte Schrittweite):**  $25 \times 25$  Pixel ( $65\text{ steps/ Pixel} \approx 8,06\text{ }\mu\text{m}$  Pixelkantenlänge)
- **Verwendetes Massenspektrometer (Untersuchungsmethode), Öffnungszeit (IT), ggfs. voreingestellte Massenauflösung, Massenbereich ( $m/z$ ):** LTQ MS ( $\text{MS}^1$ ), 600 ms,  $m/z$  600-1200 Da
- **Spektrientyp (Anzahl Pulse pro Spektrum)/Anzahl Spektren pro Pixel:** Einzelschussspektren/1
- **Software:** LTQTune 1.0, Xcalibur 1.4 SR 1
- **Ionenquelleneinstellungen (Laserpulsenergie, Potential Proben-teller und Ionenblende):**  $1,2\text{ }\mu\text{J}$ , 2,5 kV, 100 V

##### 30×30 Scan

- **Analyt (MW, Analytkonzentration) und Präparation:** Synthetisches Peptid SLLPAIVEL ( $m/z$  953,5797 Da;  $4 \cdot 10^{-6}$  mol/L), in  $\text{H}_2\text{O}$  dest. gelöst, verdünnt mit Zellpuffer 2, Zellpufferpräparation durch Verwendung einer mikromanipulierbaren *fused silica* Kapillare auf geätzten Silizium Wafer, Trocknung an der Luft
- **Abgerasterter Bereich (voreingestellte Schrittweite):**  $30 \times 30$  Pixel ( $60\text{ steps/ Pixel} \approx 7,44\text{ }\mu\text{m}$  Pixelkantenlänge)

- **Verwendetes Massenspektrometer (Untersuchungsmethode), Öffnungszeit (IT), ggfs. voreingestellte Massenauflösung, Massenbereich (m/z):** LTQ MS ( $MS^1$ ), 350 ms, m/z 150-2000 Da
- **Spektrrentyp (Anzahl Pulse pro Spektrum)/Anzahl Spektren pro Pixel:** Einzelschusspektren/1
- **Software:** LTQTune 1.0, Xcalibur 1.4 SR 1
- **Ionenquelleneinstellungen (Laserpulsenergie, Potential Proben-teller und Ionenblende):** 27 nJ, 2,7 kV, 210 V

#### 12×35 Scan

- **Analyt (MW, Analytkonzentration) und Präparation:** Synthetisches Peptid (Sequenz: His-Val-Gln-Asp-Leu-Asp-Met-Asn-Leu; m/z 1083,53825 Da;  $7 \cdot 10^{-6}$  mol/L), in  $H_2O$  dest. gelöst, verdünnt mit Zellpuffer 2, Zellpufferpräparation durch Verwendung einer mikromanipulierbaren *fused silica* Kapillare auf geätzten Silizium Wafer, Trocknung an der Luft
- **Abgerasterter Bereich (voreingestellte Schrittweite):** 12×35 Pixel (80 steps/Pixel  $\approx 9,92 \mu m$  Pixelkantenlänge)
- **Verwendetes Massenspektrometer (Untersuchungsmethode), Öffnungszeit (IT), ggfs. voreingestellte Massenauflösung, Massenbereich (m/z):** LTQ MS ( $MS^2$ , CID: 28), 400 ms, m/z 295-1200 Da
- **Spektrrentyp (Anzahl Pulse pro Spektrum)/Anzahl Spektren pro Pixel:** Einzelschusspektren/3
- **Software:** LTQTune 2.0, Xcalibur 2.0
- **Ionenquelleneinstellungen (Laserpulsenergie, Potential Proben-teller und Ionenblende):** 38 nJ, 2,7 kV, 180 V

#### 30×30 Scan

- **Analyt (MW, Analytkonzentration) und Präparation:** Bradykinin 1-7 (m/z 756,39 Da;  $1,2 \cdot 10^{-6}$  mol/L), Angiotensin II (m/z 1045,53 Da;  $1,2 \cdot 10^{-6}$  mol/L), in  $H_2O$  dest. gelöst, verdünnt mit Zellpuffer 2. *dried droplet* Präparation von 10  $\mu l$ , kurz angetrocknet (Fön), anschließend Trocknung für 1,5 Stunden bei 37°C (Trockenschrank), Strukturierung mittels TEM Gitter 50  $\mu m$  lichte Weite und 13  $\mu m$  Stegbreite, Kontaktierung durch Leitsilber

- **Abgerasterter Bereich (voreingestellte Schrittweite):** 30×30 Pixel (65 steps/Pixel $\approx$ 8,06  $\mu$ m Pixelkantenlänge)
- **Verwendetes Massenspektrometer (Untersuchungsmethode), Öffnungszeit (IT), ggfs. voreingestellte Massenauflösung, Massenbereich (m/z):** FT MS ( $MS^1$ ), 800 ms, 50000, m/z 600-1200 Da
- **Spektrrentyp (Anzahl Pulse pro Spektrum)/Anzahl Spektren pro Pixel:** Einzelschusspektren/1
- **Software:** LTQTune 1.0, Xcalibur 1.4 SR 1
- **Ionenquelleneinstellungen (Laserpulsenergie, Potential Proben-teller und Ionenblende):** 1,2  $\mu$ J, 2,5 kV, 100 V

#### 4.11.4 SMALDI – *bioprinted molecules*

##### 20×60 Scan – Lipide

- **Analyt (MW, Analytkonzentration) und Präparation:** Cholesterin (m/z 386,3549 Da;  $2,6 \cdot 10^{-3}$  mol/L), Phosphatidylcholin 34:1 (m/z 760,5856 Da;  $1,3 \cdot 10^{-3}$  mol/L), gelöst in 100 % Methanol + 0,1 % TFA zusammen mit 5 mg/mL 2,5-DHB, 4×5 nL gedruckt, jeweils 5×5 Muster mit 400  $\mu$ m Abstand zwischen den Druckpunkten, mit 20  $\mu$ l 25 mg/mL 2,5-DHB in 50 % Ethanol + 0,1 % TFA mittels *Airspray* nachbesprüht.
- **Abgerasterter Bereich (voreingestellte Schrittweite):** 20×60 Pixel (100 steps/Pixel $\approx$ 12,41  $\mu$ m Pixelkantenlänge)
- **Verwendetes Massenspektrometer (Untersuchungsmethode), Öffnungszeit (IT), ggfs. voreingestellte Massenauflösung, Massenbereich (m/z):** LTQ MS ( $MS^1$ ), 400 ms, m/z 150-2000 Da
- **Spektrrentyp (Anzahl Pulse pro Spektrum)/Anzahl Spektren pro Pixel:** Einzelschusspektren/2
- **Software:** LTQTune 2.0, Xcalibur 2.0
- **Ionenquelleneinstellungen (Laserpulsenergie, Potential Proben-teller und Ionenblende):** 37 nJ, 2,7 kV, 170 V

##### MALDI – Lipide (LTQ MS, $MS^2$ )

- **Analyt (MW, Analytkonzentration) und Präparation:** Cholesterin (m/z 386,3549 Da;  $2,6 \cdot 10^{-3}$  mol/L), Phosphatidylcholin 34:1 (m/z

760,5856 Da;  $1,3 \cdot 10^{-3}$  mol/L), gelöst in 100 % Methanol + 0,1 % TFA zusammen mit 5 mg/mL 2,5-DHB,  $4 \times 5$  nL gedruckt, jeweils  $5 \times 5$  Muster mit  $400 \mu\text{m}$  Abstand zwischen den Druckpunkten, mit  $20 \mu\text{l}$  25 mg/mL 2,5-DHB in 50 % Ethanol + 0,1 % TFA mittels *Airspray* nachbesprüht.

- **Verwendetes Massenspektrometer (Untersuchungsmethode), Öffnungszeit (IT), ggfs. voreingestellte Massenauflösung, Massenbereich (m/z):** LTQ MS ( $\text{MS}^2$ , CID: 12), 400 ms, m/z 175-800 Da
- **Spektrrentyp (Anzahl Pulse pro Spektrum)/Anzahl Spektren pro Pixel:** Einzelschussspektren/1
- **Software:** LTQTune 2.0, Xcalibur 2.0
- **Ionenquelleneinstellungen (Laserpulsenergie, Potential Proben-teller und Ionenblende):** 35 nJ, 2,7 kV, 170 V

#### MALDI – Lipide (FT MS, $\text{MS}^1$ )

- **Analyt (MW, Analytkonzentration) und Präparation:** Cholesterin (m/z 386,3549 Da;  $2,6 \cdot 10^{-3}$  mol/L), Phosphatidylcholin 34:1 (m/z 760,5856 Da;  $1,3 \cdot 10^{-3}$  mol/L), gelöst in 100 % Methanol + 0,1 % TFA zusammen mit 5 mg/mL 2,5-DHB,  $4 \times 5$  nL gedruckt, jeweils  $5 \times 5$  Muster mit  $400 \mu\text{m}$  Abstand zwischen den Druckpunkten, mit  $20 \mu\text{l}$  25 mg/mL 2,5-DHB in 50 % Ethanol + 0,1 % TFA mittels *Airspray* nachbesprüht.
- **Verwendetes Massenspektrometer (Untersuchungsmethode), Öffnungszeit (IT), ggfs. voreingestellte Massenauflösung, Massenbereich (m/z):** FT MS SIM ( $\text{MS}^1$ ), 400 ms, m/z, 25000, 745-775 Da
- **Spektrrentyp (Anzahl Pulse pro Spektrum)/Anzahl Spektren pro Pixel:** Einzelschussspektren/1
- **Software:** LTQTune 2.0, Xcalibur 2.0
- **Ionenquelleneinstellungen (Laserpulsenergie, Potential Proben-teller und Ionenblende):** 35 nJ, 2,7 kV, 170 V

#### 20×20 Scan – Peptide (5 nL)

- **Analyt (MW, Analytkonzentration) und Präparation:** Bradykinin 1-5 (m/z 572,3071 Da;  $2 \cdot 10^{-6}$  mol/L), Angiotensin II (m/z 1045,5345 Da;  $1,2 \cdot 10^{-6}$  mol/L), Neurotensin (m/z 1671,9097 Da;  $0,8 \cdot 10^{-6}$  mol/L), ACTH (m/z 2464,1909 Da;  $1 \cdot 10^{-6}$  mol/L), Bovines Insulin B-Kette (m/z

3397,9739 Da;  $5 \cdot 10^{-6}$  mol/L) gelöst in 30 % Acetonitril + 0,1 % TFA zusammen mit 5 mg/mL 2,5-DHB, 5 nL gedruckt, jeweils  $5 \times 5$  Muster mit  $300 \mu\text{m}$  Abstand zwischen den Druckpunkten, mit  $1 \times 20 \mu\text{l}$  25 mg/mL 2,5-DHB in 50 % Ethanol + 0,1 % TFA mittels *Airspray* nachbesprüht.

- **Abgerasterter Bereich (voreingestellte Schrittweite):**  $20 \times 20$  Pixel (70 steps/Pixel  $\approx 8,68 \mu\text{m}$  Pixelkantenlänge)
- **Verwendetes Massenspektrometer (Untersuchungsmethode), Öffnungszeit (IT), ggfs. voreingestellte Massenauflösung, Massenbereich (m/z):** LTQ MS ( $\text{MS}^1$ ), 400 ms, m/z 150-2000 Da
- **Spektrrentyp (Anzahl Pulse pro Spektrum)/Anzahl Spektren pro Pixel:** Einzelschusspektren/1
- **Software:** LTQTune 2.0, Xcalibur 2.0
- **Ionenquelleneinstellungen (Laserpulsenergie, Potential Proben-teller und Ionenblende):** 25 nJ, 2,7 kV, 176 V

#### MALDI – Peptide (20 nL)

- **Analyt (MW, Analytkonzentration) und Präparation:** Bradykinin 1-5 (m/z 572,3071 Da;  $2 \cdot 10^{-6}$  mol/L), Angiotensin II (m/z 1045,5345 Da;  $1,2 \cdot 10^{-6}$  mol/L), Neurotensin (m/z 1671,9097 Da;  $0,8 \cdot 10^{-6}$  mol/L), ACTH (m/z 2464,1909 Da;  $1 \cdot 10^{-6}$  mol/L), Bovines Insulin B-Kette (m/z 3397,9739 Da;  $5 \cdot 10^{-6}$  mol/L) gelöst in 30 % Acetonitril + 0,1 % TFA zusammen mit 5 mg/mL 2,5-DHB,  $4 \times 5$  nL gedruckt, jeweils  $5 \times 5$  Muster mit  $300 \mu\text{m}$  Abstand zwischen den Druckpunkten, mit  $2 \times 20 \mu\text{l}$  25 mg/mL 2,5-DHB in 50 % Ethanol + 0,1 % TFA mittels *Airspray* nachbesprüht.
- **Verwendetes Massenspektrometer (Untersuchungsmethode), Öffnungszeit (IT), ggfs. voreingestellte Massenauflösung, Massenbereich (m/z):** LTQ MS ( $\text{MS}^2$ , CID: 25, *data dependent*), 400 ms, m/z 145-585 Da (Vorläuferionenspektrum)
- **Spektrrentyp (Anzahl Pulse pro Spektrum)/Anzahl Spektren pro Pixel:** Einzelschusspektren/4
- **Software:** LTQTune 2.0, Xcalibur 2.0
- **Ionenquelleneinstellungen (Laserpulsenergie, Potential Proben-teller und Ionenblende):** 37 nJ, 2,5 kV, 100 V

#### $20 \times 24$ Scan – Peptide (20 nL)

- **Analyt (MW, Analytkonzentration) und Präparation:** Bradykinin 1-5 (m/z 572,3071 Da;  $2 \cdot 10^{-6}$  mol/L), Angiotensin II (m/z 1045,5345 Da;  $1,2 \cdot 10^{-6}$  mol/L), Neurotensin (m/z 1671,9097 Da;  $0,8 \cdot 10^{-6}$  mol/L), ACTH (m/z 2464,1909 Da;  $1 \cdot 10^{-6}$  mol/L), Bovines Insulin B-Kette (m/z 3397,9739 Da;  $5 \cdot 10^{-6}$  mol/L) gelöst in 30 % Acetonitril + 0,1 % TFA zusammen mit 5 mg/mL 2,5-DHB,  $4 \times 5$  nL gedruckt, jeweils  $5 \times 5$  Muster mit  $300 \mu\text{m}$  Abstand zwischen den Druckpunkten, mit  $2 \times 20 \mu\text{l}$  25 mg/mL 2,5-DHB in 50 % Ethanol + 0,1 % TFA mittels *Airspray* nachbesprüht.
- **Abgerasterter Bereich (voreingestellte Schrittweite):**  $24 \times 24$  Pixel ( $70 \text{ steps/ Pixel} \approx 8,68 \mu\text{m}$  Pixelkantenlänge)
- **Verwendetes Massenspektrometer (Untersuchungsmethode), Öffnungszeit (IT), ggfs. voreingestellte Massenauflösung, Massenbereich (m/z):** FT MS ( $\text{MS}^1$ ), 500 ms, 50000, m/z 200-1100 Da
- **Spektrtyp (Anzahl Pulse pro Spektrum)/Anzahl Spektren pro Pixel:** Multischussspektrum(5)/1
- **Software:** LTQTune 2.0, Xcalibur 2.0
- **Ionenquelleneinstellungen (Laserpulsenergie, Potential Proben-teller und Ionenblende):** 38 nJ, 2,8 kV, 100 V

### 35×30 Scan – Peptide (5 nL)

- **Analyt (MW, Analytkonzentration) und Präparation:** Bradykinin 1-5 (m/z 572,3071 Da;  $2 \cdot 10^{-6}$  mol/L), Angiotensin II (m/z 1045,5345 Da;  $1,2 \cdot 10^{-6}$  mol/L), Neurotensin (m/z 1671,9097 Da;  $0,8 \cdot 10^{-6}$  mol/L), ACTH (m/z 2464,1909 Da;  $1 \cdot 10^{-6}$  mol/L), Bovines Insulin B-Kette (m/z 3397,9739 Da;  $5 \cdot 10^{-6}$  mol/L) gelöst in 30 % Acetonitril + 0,1 % TFA zusammen mit 5 mg/mL 2,5-DHB,  $4 \times 5$  nL gedruckt, jeweils  $5 \times 5$  Muster mit  $300 \mu\text{m}$  Abstand zwischen den Druckpunkten, mit  $2 \times 20 \mu\text{l}$  25 mg/mL 2,5-DHB in 50 % Ethanol + 0,1 % TFA mittels *Airspray* nachbesprüht.
- **Abgerasterter Bereich (voreingestellte Schrittweite):**  $35 \times 30$  Pixel ( $70 \text{ steps/ Pixel} \approx 8,68 \mu\text{m}$  Pixelkantenlänge)
- **Verwendetes Massenspektrometer (Untersuchungsmethode), Öffnungszeit (IT), ggfs. voreingestellte Massenauflösung, Massenbereich (m/z):** FT MS ( $\text{MS}^1$ ), 500 ms, 50000, m/z 558-588 Da
- **Spektrtyp (Anzahl Pulse pro Spektrum)/Anzahl Spektren pro Pixel:** Multischussspektrum(5)/1

- **Software:** LTQTune 2.0, Xcalibur 2.0
- **Ionenquelleneinstellungen (Laserpulsenergie, Potential Proben-teller und Ionenblende):** 27 nJ, 2,8 kV, 100 V

#### 35×32 Scan – Peptide (20 nL)

- **Analyt (MW, Analytkonzentration) und Präparation:** Bradykinin 1-5 (m/z 572,3071 Da;  $2 \cdot 10^{-6}$  mol/L), Angiotensin II (m/z 1045,5345 Da;  $1,2 \cdot 10^{-6}$  mol/L), Neurotensin (m/z 1671,9097 Da;  $0,8 \cdot 10^{-6}$  mol/L), ACTH (m/z 2464,1909 Da;  $1 \cdot 10^{-6}$  mol/L), Bovines Insulin B-Kette (m/z 3397,9739 Da;  $5 \cdot 10^{-6}$  mol/L) gelöst in 30 % Acetonitril + 0,1 % TFA zusammen mit 5 mg/mL 2,5-DHB,  $4 \times 5$  nL gedruckt, jeweils  $5 \times 5$  Muster mit  $300 \mu\text{m}$  Abstand zwischen den Druckpunkten, mit  $2 \times 20 \mu\text{l}$  25 mg/mL 2,5-DHB in 50 % Ethanol + 0,1 % TFA mittels *Airspray* nachbesprüht.
- **Abgerasterter Bereich (voreingestellte Schrittweite):**  $35 \times 32$  Pixel ( $75 \text{ steps/ Pixel} \approx 9,30 \mu\text{m}$  Pixelkantenlänge)
- **Verwendetes Massenspektrometer (Untersuchungsmethode), Öffnungszeit (IT), ggfs. voreingestellte Massenauflösung, Massenbereich (m/z):** FT MS ( $\text{MS}^2$ , CID: 28), 450 ms, 25000, m/z 125-600 Da
- **Spektrrentyp (Anzahl Pulse pro Spektrum)/Anzahl Spektren pro Pixel:** Multischusspektrum(6)/1
- **Software:** LTQTune 2.0, Xcalibur 2.0
- **Ionenquelleneinstellungen (Laserpulsenergie, Potential Proben-teller und Ionenblende):** 38 nJ, 2,8 kV, 100 V

#### 4.11.5 SMALDI – biologische Proben

##### 4.11.5.1 Zellproben (Waschprotokolle)

Ziel der Probenvorbereitung biologischer Proben ist zum einen die Minimierung von osmotischem Stress, um Form und Funktion der Zellmembran soweit wie möglich zu erhalten. Trotzdem sollen störende Komponenten weitestgehend entfernt werden. Dies sollte durch mehrstufige Waschprotokolle, mit jeweils 30Sek. dauernden Waschschritten, gewährleistet werden. Als Gefäß hierfür wurden sterile 6-well Zellkulturplatten verwendet. Darin wurden die Waschlösungen vorgelegt und die mit Zellen behafteten Substrate nacheinander vorsichtig eingetaucht. Das Eintauchen ist dabei schonender als die Applikation mittels Pipetten. Es folgen unterschiedliche Waschprotokolle die zur Vorbereitung der

Zellproben angewendet wurden:

#### **Protokoll 1**

1. 2x DPBS Puffer
2. 2x 0,3 mol/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in 25 % Ethanol (pH 7; eingestellt mit  $\text{NH}_3$ )
3. an der Luft eintrocknen lassen
4. 2x 25 % Ethanol + 0,1 % TFA

#### **Protokoll 2**

1. 2x DPBS Puffer
2. 2x 0,3 mol/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in 25 % Ethanol (pH 7; eingestellt mit  $\text{NH}_3$ )
3. an der Luft eintrocknen lassen
4. 2x  $\text{H}_2\text{O}$  dest.

#### **Protokoll 3**

1. 1x 0,3 mol/L  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in 25 % Ethanol (pH 7; eingestellt mit  $\text{NH}_3$ )
2. an der Luft eintrocknen lassen
3. 1x 10 % Ethanol
4. 1x  $\text{H}_2\text{O}$  dest.

#### **4.11.5.2 Zellproben (Einzelprobenvorbereitung)**

##### **40×50 Scan – HeLa Zellen**

- **Analyt (MW, Analytkonzentration) und Präparation:** HeLa Zellen, gewachsen in Carcinopan Medium (serumfreies Medium), nach Protokoll 2 gewaschen, Zellpuffer 1 mittels Pipette bis zur Bedeckung aufgetragen, mit Fön getrocknet
- **Abgerasterter Bereich (voreingestellte Schrittweite):** 40×50 Pixel (80 steps/Pixel $\approx$ 9,92  $\mu\text{m}$  Pixelkantenlänge)
- **Verwendetes Massenspektrometer (Untersuchungsmethode), Öffnungszeit (IT), ggfs. voreingestellte Massenauflösung, Massenbereich (m/z):** LTQ MS ( $\text{MS}^1$ ), 500 ms, m/z 150-2000 Da



- **Spektrrentyp(Anzahl Pulse pro Spektrum)/Anzahl Spektren pro Pixel:** Multischussspektrum(6)/1
- **Software:** LTQTune 2.0, Xcalibur 2.0
- **Ionenquelleneinstellungen (Laserpulsenergie, Potential Proben-teller und Ionenblende):** 28 nJ, 2,8 kV, 100 V

#### 30×40 Scan – HeLa Zellen

- **Analyt (MW, Analytkonzentration) und Präparation:** HeLa Zellen, gewachsen in Carcinopan Medium (serumfreies Medium), nach Protokoll 3 gewaschen, Zellpuffer 2a mittels Pipette bis zur Bedeckung aufgetragen, mit Fön getrocknet
- **Abgerasterter Bereich (voreingestellte Schrittweite):** 30×40 Pixel (75 steps/Pixel $\pm$ 9,30  $\mu$ m Pixelkantenlänge)
- **Verwendetes Massenspektrometer (Untersuchungsmethode), Öffnungszeit (IT), ggfs. voreingestellte Massenauflösung, Massenbereich (m/z):** LTQ MS (MS<sup>1</sup>), 500 ms, m/z 150-2000 Da
- **Spektrrentyp(Anzahl Pulse pro Spektrum)/Anzahl Spektren pro Pixel:** Multischussspektrum(5)/1
- **Software:** LTQTune 2.0, Xcalibur 2.0
- **Ionenquelleneinstellungen (Laserpulsenergie, Potential Proben-teller und Ionenblende):** 37 nJ, 2,8 kV, 100 V

#### 4.11.5.3 Gewebeproben (Waschprotokolle)

Ziel der Gewebevorbereitung war eine stärkere Entfernung von Membranlipiden mit unterschiedlich lipophilen Lösungsmitteln. Aus diesem Grund wurden die verwendeten Waschlösungen, unter kompletter Befeuchtung des Schnittes, mit der Pipette aufgetragen. Nach 30Sek. wurde die Waschlösung schräg ablaufen lassen. Folgende Waschprotokolle wurden zur Vorbereitung der Gewebeproben verwendet:

##### **Protokoll 4:** lipidfreundlicher

1. 4x waschen mit eiskaltem 50 %igen Ethanol

##### **Protokoll 5:** lipidfeindlicher

1. 2x waschen mit eiskaltem 90 % Aceton/10 % Eisessig, 2x 70 % Ethanol

**Protokoll 6:** lipidfeindlicher

1. 2x waschen mit Chloroform, 2x 70 % Ethanol

**Protokoll 7:** lipidfreundlicher

1. 4x 70 % Ethanol

#### 4.11.5.4 Gewebeproben (Einzelprobenvorbereitung)

##### 40×50 Scan – Rattenwange *Trichinella spiralis* kontaminiert

- **Analyt (MW, Analytkonzentration) und Präparation:** Nach Protokoll 4 gewaschen, Zellpuffer 2 mittels Pipette bis zur Bedeckung aufgetragen, mit Fön getrocknet, mit *Airspray* (10 mg/mL 2,5-DHB in 50 % Ethanol + 0,1 % TFA) nachbesprüht um Kristallisation auszulösen
- **Abgerasterter Bereich (voreingestellte Schrittweite):** 40×50 Pixel (70 steps/Pixel  $\approx$  8,68  $\mu$ m Pixelkantenlänge)
- **Verwendetes Massenspektrometer (Untersuchungsmethode), Öffnungszeit (IT), ggfs. voreingestellte Massenauflösung, Massenbereich (m/z):** LTQ MS ( $MS^1$ ), 400 ms, m/z 150-2000 Da
- **Spektrientyp (Anzahl Pulse pro Spektrum)/Anzahl Spektren pro Pixel:** Multischussspektrum(5)/1
- **Software:** LTQTune 2.0, Xcalibur 2.0
- **Ionenquelleneinstellungen (Laserpulsenergie, Potential Proben-teller und Ionenblende):** 38 nJ, 2,8 kV, 100 V

##### Präparation von Mäusegewebeschnitten (Muskelgewebe) mit internen Standardpeptiden

- **Analyt (MW, Analytkonzentration):** Vier Dünnschnitte von einer Mäusezunge (Schnittgröße  $\approx$  6,5×3 mm) wurden nach drei unterschiedlichen Waschprotokollen vorbereitet (2x Protokoll 5, 1x Protokoll 6, 1x Protokoll 7). Auf alle Schnitte werden je 3  $\mu$ l wässrige Peptidmischung homogen aufgetragen und eintrocknen lassen. Die Peptidmischung enthält Bradykinin 1-7 (m/z 756,39 Da;  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/L), *Anti inflammatory peptide* (m/z 1083,50187 Da;  $4 \cdot 10^{-6}$  mol/L) und Bombesin (m/z 1618,81502 Da;

$1 \cdot 10^{-6}$  mol/L). Waschung: S2 (Aceton/Eisessig (Protokoll 5)), S4 (Ethanol (Protokoll 7)), Präparation: je  $3 \mu\text{l}$  ZP2a; Waschung: S1 (Aceton/Eisessig (Protokoll 5)), S3 (Chloroform (Protokoll 6)), Präparation: je  $3 \times 20 \mu\text{l}$   $30 \text{ mg/mL}$  2,5-DHB (in 50 % Aceton + 0,1 % TFA) via *Airspray*. Die ZP2a Präparationen mussten 1x mit  $20 \mu\text{l}$   $30 \text{ mg/mL}$  2,5-DHB (in 50 % Aceton + 0,1 % TFA) zur Kristallisation nachbesprüht werden

- **Abgerasterter Bereich (voreingestellte Schrittweite):**  $30 \times 40$  Pixel und  $15 \times 20$  Pixel ( $75 \text{ steps/Pixel} \approx 9,30 \mu\text{m}$  Pixelkantenlänge;  $180 \text{ steps/Pixel} \approx 22,33 \mu\text{m}$  Pixelkantenlänge bei Strahlaufweitung)
- **Verwendetes Massenspektrometer (Untersuchungsmethode), Öffnungszeit (IT), ggfs. voreingestellte Massenauflösung, Massenbereich (m/z):** LTQ MS ( $\text{MS}^1$ ), 500 ms, m/z 150-2000 Da
- **Spektrrentyp (Anzahl Pulse pro Spektrum) / Anzahl Spektren pro Pixel:** Multischussspektrum(5)/1
- **Software:** LTQTune 2.0, Xcalibur 2.0
- **Ionenquelleneinstellungen (Laserpulsenergie, Potential Proben-teller und Ionenblende):** 38 nJ (136 nJ bei Strahlaufweitung), 2,8 kV, 100 V

## Kapitel 5

# Ergebnisse und Diskussion

Zunächst sollen die Ergebnisse der apparativen Entwicklung der neuen AP-SMALDI Ionenquelle vorgestellt werden. Zusätzlich wird auf instrumentelle Entwicklungen (Teleskopoptik) eingegangen, die nicht in den finalen Aufbau eingeflossen sind, jedoch abstrakt das Verständnis für Prozesse der Ionenentstehung und -transmission erweitern.

### 5.1 Apparative Ergebnisse (Hardware und Software)

Die Entwicklung einer vollkommen neuen, lateral hochauflösenden, rasternden Atmosphärendruck Mikrosonden MALDI Ionenquelle (AP-SMALDI), für das Hybridmassenspektrometer *Finnigan* LTQ-FT, stellt das Kernstück der apparativen Entwicklung dieser Arbeit dar. Die Ionenquelle verknüpft lateral hochauflösende, lasergestützte Probenuntersuchung mit hoher Massengenauigkeit und -auflösung am *Finnigan* LTQ-FT Massenspektrometer. Die neue, modular aufgebaute Ionenquelle bietet, neben präzisen analytischen Perspektiven, einige weitere attraktive Eigenschaften auf die im Folgenden näher eingegangen wird:

- Leichte Ankoppelbarkeit nach dem Prinzip der serienmäßigen LTQ-FT Ionenquellen (Gehäusekompatibilität),
- Hohe laterale Auflösung durch eine hochwertige, axiale Laseroptik,
- Abmessungen, die die Verwirklichung optimaler laseroptischer Bedingungen garantieren,
- Einfache Justierbarkeit,
- Verwendbarkeit/Untersuchbarkeit unterschiedlich großer Probenträger,

- Möglichkeit zum raschen Probenwechsel,
- Möglichkeit zum raschen Ionenquellenwechsel.

### 5.1.1 Modul 1

Im Folgenden werden die Komponenten des Modul 1 näher erläutert. Die Komponenten des Modul 1 befinden sich oberhalb des LTQ MS auf einer massiven Aluminiumplatte (Dicke: 15 mm). Die Platte ruht auf dem Gehäuserahmen der LTQ. Alle im Modul 1 enthaltenen Komponenten (Spiegelhalterungen, Linsenhalter, statische Abschwächer, etc.) befinden sich in fester Verbindung zur Aluminiumplatte. Die in Modul 1 verwendeten Komponenten sind in Tabelle 5.1 (S.101) aufgeführt.

#### 5.1.1.1 Optische und mechanische Bauteile

Der durch den Laser emittierte Laserstrahl passiert mehrere optische Komponenten im Modul 1. Um den Laserstrahl des MNL 202-LD axialisieren zu können, wurden drei UV reflektierende, runde Planspiegel auf Dreipunktlagerungen (Kleinspiegelhalter) verwendet. Die Energieregulation des Laserstrahls erfolgt über einen Schrittmotor gesteuerten, dielektrischen Abschwächer (näheres zur Steuerung siehe Kapitel 5.1.7.2 (S.114)). Die Kennkurve des dielektrischen Abschwächers wird in Kapitel 4.2.2 (S.69) und Abbildung 4.5 (S.71) dargestellt.

Unterschiedliche statische Abschwächer (Farbfilter, Neutralfilter) schwächen grob die Laserenergie ab und werden durch einen kontinuierlich arbeitenden, variablen Abschwächer ergänzt. Der Laserstrahl wird durch eine  $f = 25$  mm Quarzlinse vorfokussiert und danach durch einen ovalen Planspiegel in Richtung des Modul 2 reflektiert. Der ovale Planspiegel wird durch ein Tubus-Würfel-System positioniert und ragt 80 mm über die Kante der Aluminiumplatte hinaus. Der Strahlverlauf des ovalen Planspiegels kann ebenfalls fein justiert werden.

### 5.1.2 Modul 2

Beim Modul 2 handelt es sich um das eigentliche Kernstück der neu entwickelten Ionenquelle. Das aus Aluminium gefertigte Gehäuse trägt sowohl einen zentraldurchbohrten, ovalen Planspiegel, als auch das speziell angefertigte zentraldurchbohrte, mehrlinsige Quarz-Laserobjektiv. Dieses Modul ist dadurch zentraler Bestandteil der Laserfokussierung auf die Probe. Zusätzlich sind die Beobachtungsoptik und die Ionenoptik in das Modul implementiert (Abb.5.2, S.103). Zum Modul 2 zählt ebenso die neu entwickelte, verlängerte Ionentransferkapillare. Das Aluminiumgehäuse des Modul 2 wird zusätzlich durch ein Stahlgestell

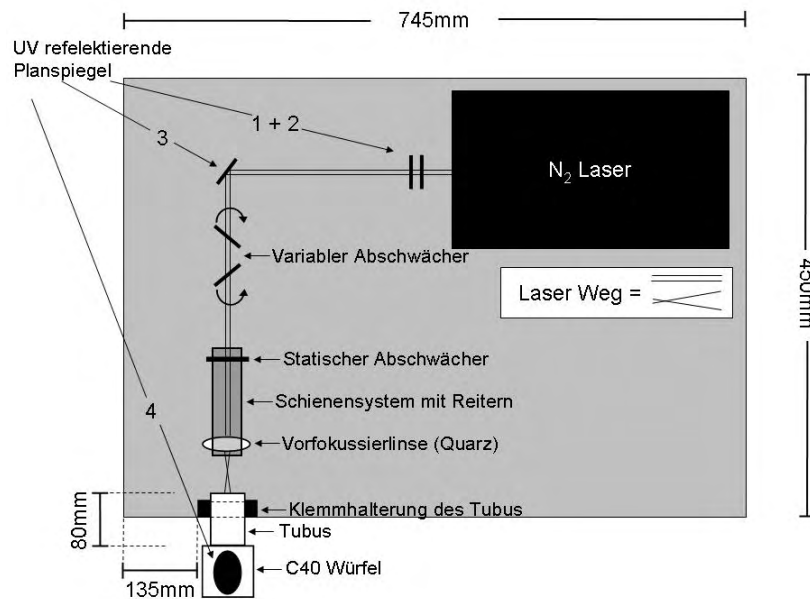


Abbildung 5.1: Modul 1

Anordnung der verwendeten optischen und mechanischen Bauteile (Planspiegel, statischer/variabler Abschwächer, Quarz-Vorfokussierlinse, Halterungen, Schienensystem und -reiter) in der Aufsicht.

gestützt, um Vibrationen zu minimieren. Die im Modul 2 verwendeten Bauteile sind in Tabelle 5.2 (S.102) und Tabelle 5.3 (S.105) aufgeführt.

#### 5.1.2.1 Quarzfenster, Spiegel und Objektiv

Der Laserstrahl passiert beim Erreichen des Modul 2 zunächst ein Quarzfenster. Danach trifft dieser auf einen großen, ovalen, dielektrisch beschichteten und hoch-UV-reflektierend Planspiegel (Neigung =  $45^\circ$ ). Der Spiegel (Substrat: Suprasil, 6 mm dick) ist auf einer vakuumfesten Dreipunktlagerung und speziellen Feingewindeschrauben (feinjustierbar) gelagert. Nun trifft der Laserstrahl auf das durchbohrte, mehrlinsige Quarzobjektiv (S&H Scientific Instruments). Die Bildweite beträgt 360 mm, der Brennpunkt (gegenstandsseitig) liegt in 40 mm Abstand vom Objektiv. Diese Werte gelten bei Vorfokussierung des Laserstrahls durch eine  $f = 25$  mm Quarzlinse ( $L_1$ ). Der Abstand der Linsen (Mittelpunktebene  $L_1$  zu Hinterkante gefasstes Objektiv) beträgt somit 385 mm. Die numerische Apertur (NA) des Objektivs beträgt 0,429. Die hintere Öffnungsweite ist 30 mm (einfallendes Laserlicht), die vordere 38 mm (ausfallendes Laserlicht). Aus Gleichung (siehe Gl.??, S.??) und den gegebenen Werten (Fokusbrennweite Vorfokussierlinse = Zwischenbildgröße  $\approx 20 \mu\text{m}$  Ø;  $1/e^2$ -Kriterium) ergibt sich für den Fokusbrennweite etwa ein Wert von  $G = 2 \mu\text{m}$ . Die axiale Ausdehnung

Tabelle 5.1: OPTISCHE UND MECHANISCHE BAUTEILE DES MODUL 1  
Spezifikation und Hersteller der verwendeten optischen und mechanischen Bauteile.

Bauteil	Spezifikation	Hersteller
UV-VIS reflektierender, runder Planspiegel	Aluminium bedampft, 25,4 mm $\varnothing$ ; $\lambda/10$	Linos Photonics
UV reflektierender, ovaler Planspiegel	Aluminium bedampft, 22,4×31,5 mm; $\lambda/10$	Linos Photonics
Kleinspiegelhalter (für runde Planspiegel)		Owis GmbH
Quarzlinse	bikonvex, $f = 25$ mm, 22,4 mm $\varnothing$	Linos GmbH
x,y-Justieraufnahmeplatte	I.D. 25 mm	Owis GmbH
Schienensystem SYS 40		Owis GmbH
Reiter RT 40-10-R	Breite 10 mm	Owis GmbH
Tubus C30	Länge 85 mm	Linos Photonics
Klemmhalter Tubus C	für Tubus C 30	Linos Photonics
Würfel C40	Kantenlänge 40 mm	Linos Photonics
Umlenkspiegelsatz (für Ovalspiegel)	justierbar	Linos Photonics

des Fokus (Rayleigh-Länge) beträgt damit  $\approx 40 \mu\text{m}$  (siehe Gl.3.3, S.17). Trifft ein paralleler Laserstrahl auf das Laserobjektiv so verkürzt sich dessen Arbeitsabstand auf  $<40$  mm (siehe Kapitel 5.11, S.119).

#### 5.1.2.2 Ionenoptischer Aufbau

Der Ionenoptische Aufbau der neuen AP-SMALDI Ionenquelle besteht aus dem Probenhalter, der elektrostatischen Ionenblende und der verlängerten Ionenentransferkapillare. Das Design der Blende ist in Kapitel 4.2.4 (S.70) dargestellt. Die Blende wird von vier PEEK Stäben positioniert (Klemmhalterung; 34 mm Abstand: Vorderkante Laserobjektiv bis Hinterkante Blende, siehe

Tabelle 5.2: LASEROPTISCHE BAUTEILE DES MODUL 2

Spezifikation und Hersteller der verwendeten laseroptischen Komponenten.

Bauteil	Spezifikation	Hersteller
Quarzfenster	60 mm Ø, Dicke 10 mm	Owis GmbH
UV-VIS reflektierender, ovaler Planspiegel	dielektrisch beschichtet, 50×70×6 mm ; $\lambda/10$ , zentral durchbohrt	Owis GmbH
Quarz-Laser-Objektiv	dreilinsig, gefaßt zentral durchbohrt, hintere Öffnungsweite: 30 mm Ø, vordere Öffnungsweite: 38 mm Ø	S&H Scientific Instruments

Abb.5.2, S.103). Die Spannungsversorgung des Probenhalters und der Ionenblende werden durch jeweils ein HV-Netzteil der Firma FUG (Probenhalternetzteil: FUG HCN35-6500; Ionenblendennetzteil: FUG HCL35-20000), angeschlossen durch einen SHV-NIM Stecker (Farnell, Radiall R317.580), gewährleistet. Die verlängerte Ionentransferkapillare wird durch ein internes Netzteil des Massenspektrometers mit Spannung versorgt. Die Entwicklung der verlängerten Ionentransferkapillare ermöglichte erst die Anwendung der AP-SMALDI Ionenquelle.

**5.1.2.2.1 Die verlängerte Ionentransferkapillare** Die Kapillare ist insgesamt 227 mm lang: 96,25 mm befinden sich innerhalb des MS, 130,75 mm ragen heraus. Die Kapillare hat 1,6 mm Außendurchmesser und 0,6 mm Innendurchmesser (Harry Rieck Edelstahl GmbH). Die Ionentransferkapillare wird durch ein dickeres Edelstahlrohr (A.D. 5 mm, I.D. 1,7 mm) geführt, um die Axialität zu verbessern. Sowohl das Führungsröhrchen als auch die Ionentransferkapillare werden durch einen Messingfuß gehalten. Das Führungsröhrchen ist verschraubt, die Ionentransferkapillare verlötet. Auch andere als die in Abbildung 5.3 (S.104) dargestellte Kapillarform wurden getestet (z.B. unterschiedliche Innendurchmesser), führten aber zu keiner Verbesserung.

### 5.1.2.3 Die Beobachtungsoptik

Zur Beobachtung der Probe wurde eine indirekte Beobachtungsoptik gewählt. Licht der Probe wird über insgesamt drei Umlenkspiegel und eine gläserne Bikonvexlinse (Achromat,  $f = 100$  mm) zu einer CCD-Kamera geführt (siehe Abb. 5.4, S.104). Auf dem Lichtweg zwischen dem ersten Spiegel, der sich teilweise



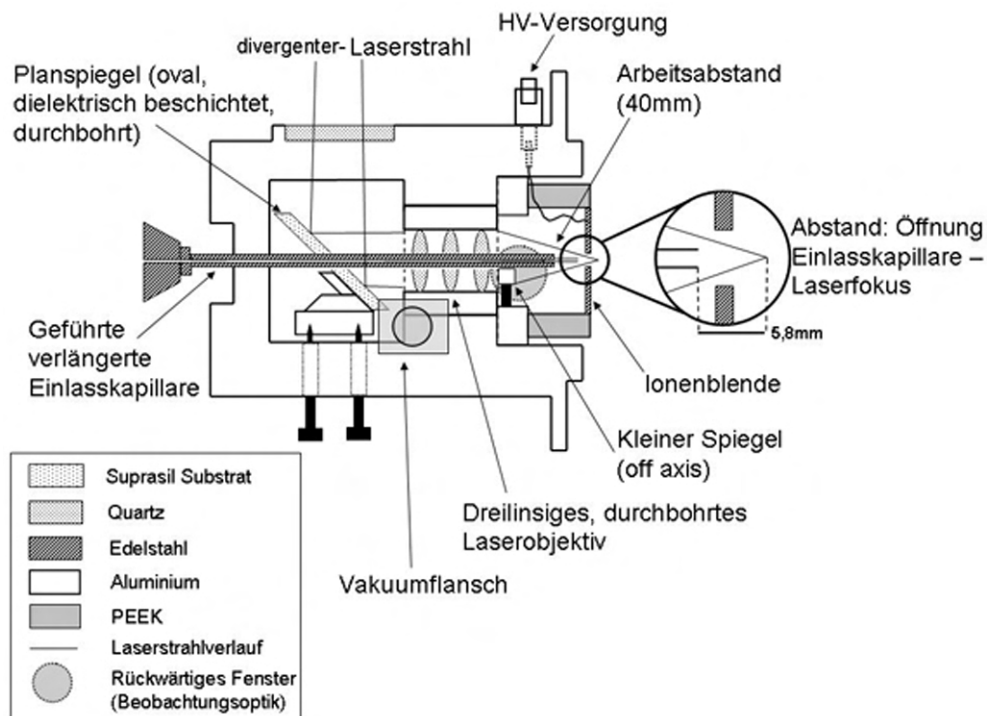


Abbildung 5.2: Modul 2

Verlauf des Laserstrahls und Anordnung der optischen und ionenoptischen Komponenten (Seitenansicht). Laseroptik: Nach Passage des Quarzfensters wird der divergente Laserstrahl am  $45^\circ$  geneigten, ovalen und durchbohrten Planspiegel reflektiert. Er trifft auf die Rückseite des durchbohrten mehrlinsigen Quarzobjektivs. Der divergente Laserstrahl wird in einem Abstand von 40 mm vor dem Objektiv fokussiert. Die Einlassöffnung der verlängerten und geführten Ionentransferkapillare hat einen Abstand von 5,8 mm zum Laserfokus. Vier PEEK-Stäbe halten die Ionenblende (Spannungsversorgung durch: SHV-NIM Stecker). Beobachtungsoptik: Der kleine Beobachtungsspiegel (off-axis) reflektiert das Bild der Probe durch das rückwärtige Beobachtungsfenster nach außen (weitere Komponenten der Beobachtungsoptik (Achromat, Tuben, Spiegel, CCD-Kamera) sind nicht dargestellt). Die Beobachtungsoptik ermöglicht eine 4-fache Vergrößerung.

im Strahlengang des Laserstrahls innerhalb des Gehäuses befindet, und der Glaslinse außerhalb des Gehäuses, befindet sich ein gedichtetes Fenster. Die Glaslinse befindet sich in 100 mm Entfernung vom Beobachtungsobjekt und in 400 mm Abstand zu einer s/w CCD-Kamera. Die Linse, VIS-Umlenkspiegel und eine CCD-Kamera sind Bestandteil eines Würfel-Tubus-Systems. Das Würfel-Tubus-System ist mittels eines Klemmhalters an der Außenseite von Modul 2 angebracht. Der letzte Tubus im System wurde selbst entwickelt und gebaut und ermöglicht eine stufenlose Längenverstellung (Teleskop), um die die Bildschärfe der CCD-Kamera regulieren zu können. Das 100:400-Verhältnis erzielt eine 4-fache Vergrößerung der Beobachtungsoptik.

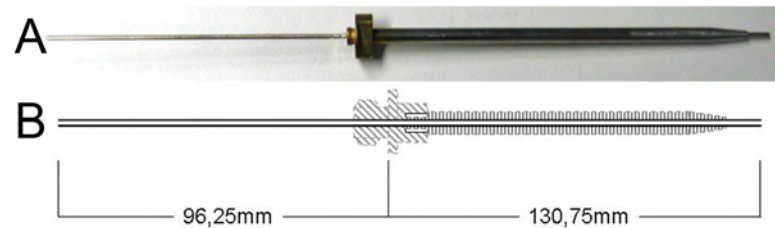


Abbildung 5.3: Verlängerte Ionentransferkapillare (Foto, Schemazeichnung) (A) Fotografie der verlängerten, geführten Ionentransferkapillare. (B) Schematische Darstellung der Ionentransferkapillare (schwarz, durchgehend). Gesamtlänge Ionentransferkapillare 227 mm (130,75 mm außerhalb des MS; 96,25 mm innerhalb des MS), A.D. 1,6 mm, I.D. 600  $\mu\text{m}$ . Führungsröhrchen der dünnen Ionentransferkapillare (grau, vertikal schraffiert): A.D. 5 mm, I.D. 1,7 mm). Das Führungsröhrchen gewährleistet eine verbesserte Erwärmung und präzisere Ausrichtung der Ionentransferkapillare. Messingfuß (grau, diagonal schraffiert): trägt eingeschraubtes Führungsröhrchen und eingelötete Ionentransferkapillare, wird in den Konus des MS eingeschraubt.

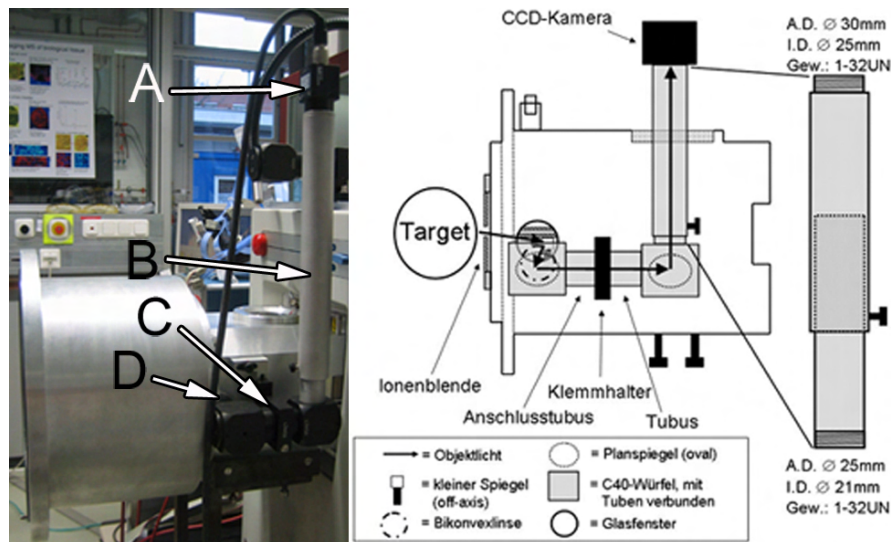


Abbildung 5.4: Modul 2 – Beobachtungsoptik (Foto, Schemazeichnung) (links) Fotografie des Aufbaus der Beobachtungsoptik an der Seite des Modul 2 (A = s/w CCD-Kamera, B=Teleskoprohr zur Schärfenregulierung, C=Würfel-Tubus-System, D=rundes, gedichtetes Fenster). (rechts) Schematische Abbildung des Aufbaus der Beobachtungsoptik. Lichtweg: von der Probe emittiertes Licht gelangt durch die Durchbohrung in der Ionenblende, den kleinen off-axis Spiegel bis zum Glasfenster, dann zur bikonvexen Glaslinse (100 mm Abstand von der Probe; Achromat,  $f = 100 \text{ mm}$ ) und dem 400 mm langen Würfel-Tubus-System (zwei ovale Planspiegel, s/w CCD-Kamera).

### 5.1.3 Modul 3

Das dritte Modul der neuen AP-SMALDI Ionenquelle besteht aus einem Aluminium-Hohlzylinder mit 230 mm Innendurchmesser und 10 mm Wandstärke. Im Innern befindet sich der x,y,z-Probenverfahrtisch. Im Verschlussdeckel sind

Tabelle 5.3: BAUTEILE DER BEOBACHTUNGSOPTIK AM MODUL 2  
Spezifikation und Hersteller der in der Beobachtungsoptik verwendeten optischen und mechanischen Bauteile.

Bauteil	Spezifikation	Hersteller
S/W Kamera TELI CS 8630Ci (Tokyo Electronic Industry, Co., LTD.)	1/3" CCD Chip	NET GmbH
CON-BOX-BAS	Verbindungs- elektronik zum PC und Kamerastrom- versorgung	NET GmbH
Würfel C40	Kantenlänge 40 mm	Linos Photonics
Bikonvexlinse	f = 100 mm, Glas	OWIS GmbH
UV-VIS reflek- tierender, ovaler Planspiegel	Aluminium bedampft, 22,4×31,5 mm, $\lambda/10$	Linos Photonics
Umlenkspiegel- einsatz (für Ovalspegel)	justierbar	Linos Photonics
Klemmhalter Tubus C	für Tubus C 30	Linos Photonics
Abschlussring C30x6	Linsenhalter für Würfel C40	Linos Photonics
Anschlusstubus C30 mit Konterring	Verstellweg max. 10 mm	Linos Photonics
Tubus C30	Länge 25 mm	Linos Photonics

Kabeldurchführungen der Steuerkabel (siehe Abb.5.5, S.106) und ein Hochspannungsanschluss enthalten.

Das Modul 3 ist auf der zum Modul 2 weisenden Seite auf 136 mm  $\varnothing$  verengt. Der entstehende Innenflansch weist sechs Bohrungen auf, durch die das Modul 3 am Modul 2 befestigt wird. Ein Dichtungsring gewährleistet die Vakuumtauglichkeit. An der außenliegenden Seite des Modulzylinders wurde ein Flansch ( $\varnothing$  300 mm, 40 mm stark) eingearbeitet. Auch hier wurde eine Dichtung vorgesehen. Der Deckel zum Verschließen des Hohlzylinders besteht aus 20 mm dickem Plexiglas (Sichtkontrolle) und wird mit sechs Rändelschrauben am Flansch befestigt. Am Deckel ist die Grundplatte befestigt, die den

x,y,z-Probenverfahrtisch trägt. Diese besteht aus 10 mm starkem Aluminium und wurde mit vier Langlöchern versehen. Somit kann die Position des x,y,z-Probenverfahrtisches variiert werden. Dies ist teilweise bei stark in der Größe variierenden Proben notwendig. Zur vakuumdichten Durchführung der Steuer-

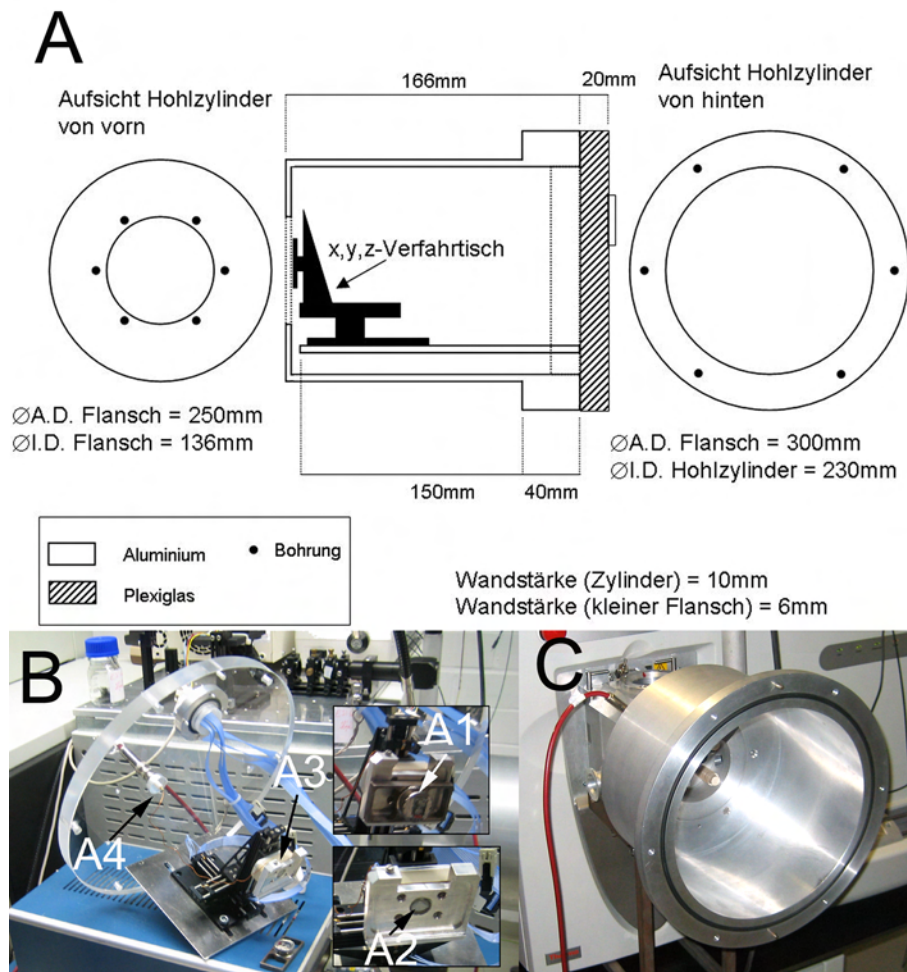


Abbildung 5.5: Modul 3 (Schemazeichnung, Foto)

(A) Schematische Abbildung Modul 3 (Stirn-, Seiten-, Rückansicht). Wanddicke Zylinder = 10 mm, Wanddicke Stirnseiten-Flansch = 6 mm. In der Stirnseite befinden sich sechs Bohrungen zur O-Ring gedichteten Verschraubung von Modul 3 und Modul 2. Der rückseitige Flansch weist sechs Gewinde auf, um einen Deckel aus Plexiglas festzuschrauben. Am Deckel ist eine Aluminiumplatte verankert, die den x,y,z-Verfahrtisch trägt. Zusätzlich enthält der Deckel die Durchführung der Spannungsversorgung der Probe und der Verfahrtischsteuerung. (B) Detailfotografie der Probenaufnahme/-halterung, Plexiglasdeckel, Basisplatte des x,y,z-Probenverfahrsystems und System selbst (A1 = Edelstahlhalterung für Probenteller, A2 = starker Permanentmagnet, A3 = PEEK-Adapter, A4 = HV-Versorgung. (C) Rückansicht Modul 3 mit hinterem Flansch. Das x,y,z-Probenverfahrsystem ragt in den Hohlzylinder hinein und die Probe kann zur Untersuchung verfahren werden.

kabel wurde ein spezieller „Viellochflansch“ (30 Bohrungen) entwickelt. Die zur Steuerung des x,y,z-Probenverfahrtisches notwendigen Flachbandkabel wurden durchtrennt, aufgefasert und mit UHU<sup>®</sup> endfest 300 vakuumdicht eingegossen. Das Modul 3 wurde so konzipiert, dass 54×36 mm große Probenträger im Zylinder bewegt und untersucht werden können.

#### 5.1.4 Justierung der AP-SMALDI Ionenquelle

Die Justierung der AP-SMALDI Ionenquelle erfordert einen nicht unerheblichen Zeitaufwand, da nach einem Wechsel der Ionenquelle die verlängerte Ionentransferkapillare, das Modul 2 und das Modul 3 montiert und justiert werden müssen. Zur wöchentlichen Kalibrierung des LTQ-FT muss, wie schon beschrieben, ein stetiges Ionensignal gewährleistet sein. Die Entwicklung eines Kalibrieradapters erleichterte dies immens (näheres siehe Kapitel 4.1.1, S.64).

Zur Justierung der AP-SMALDI Ionenquelle wurde ein Standard MALDI Probenträger (siehe Abb.4.6, S.73) verwendet, der mit einer einzigen Farbstoffschicht präpariert wurde (siehe Kapitel 4.8.1, S.77). Die manuelle Justierung der AP-SMALDI Ionenquelle erfolgt in acht Schritten:

##### Grobjustierung

1. Zentrierte, axiale Ausrichtung der Öffnung der Ionentransferkapillare und der Bohrung der Ionenblende nach der Montage am MS nach Augenmaß und mittels Lineal (Zentrum der Ionenblende vor Zentrum der Ionentransferkapillare), axiale Positionierung des Laserfokus über dem Zentrum der Ionentransferkapillare nach Augenmaß und Beobachtungsoptik (Hilfe durch dessen Autofluoreszenzsignal auf Papier).

##### Feinjustierung

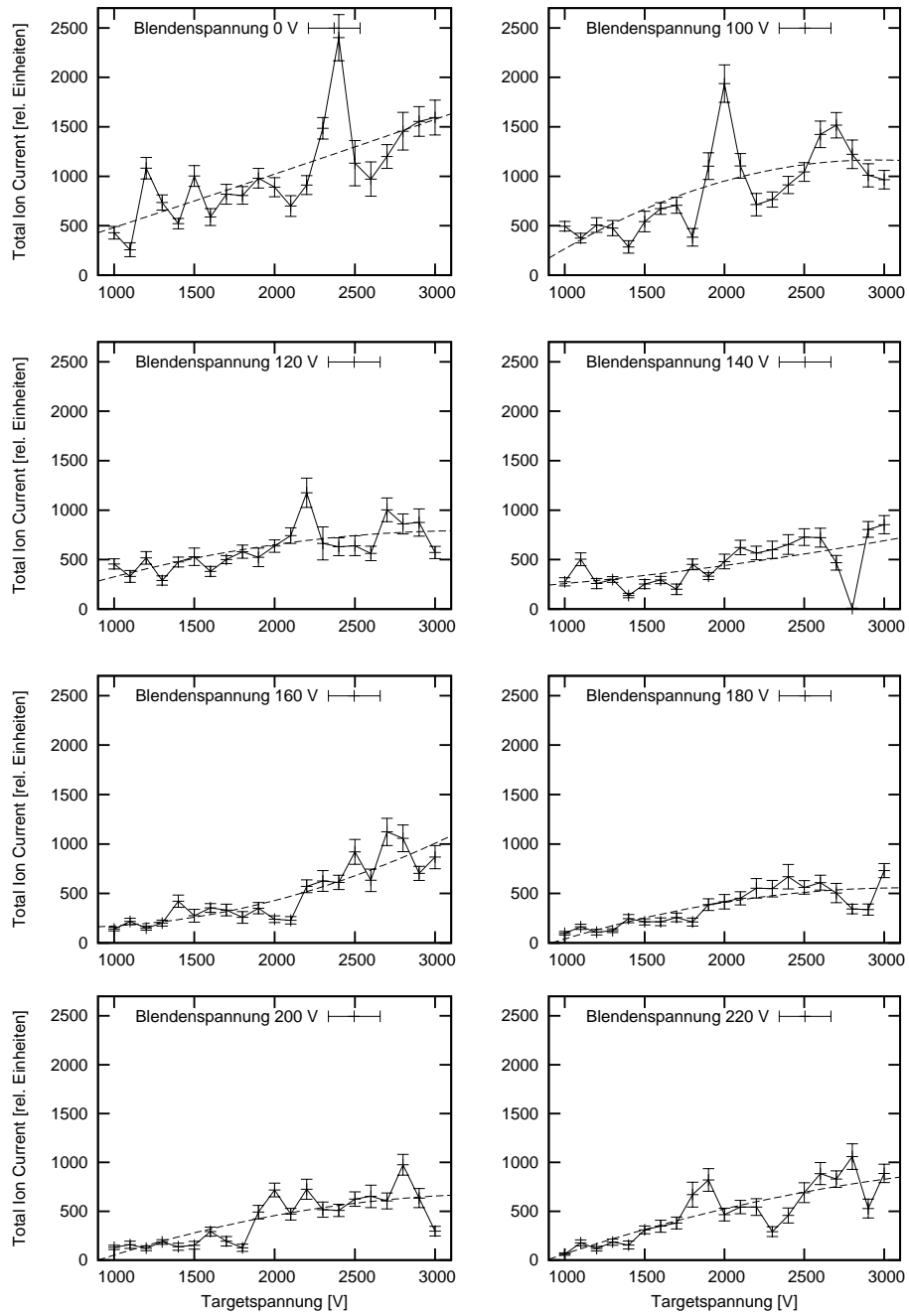
2. Mittels Farbstoff präpariertem Probenteller. Abschwächung des Laserstrahls mittels 1 % statischem Abschwächer, minimale Abschwächung durch variablen Abschwächer (50 steps), der Teller wird in den Laserfokus gefahren (z-Achse, Kontrolle über Beobachtungsoptik), erkennbar an deutlicher Farbstoffablation.
3. Verfahren des Probentellers im Laserfokus unter Einzelschussmodus (Verfahrgeschwindigkeit: 200-300 steps) und Kontrolle der Stärke des Ionensignals (Normalized Level) am messenden LTQ MS.
4. Vorsichtiges verstellen der Position des Laserfokus auf der Probe über Positionierung (Feingewindeschrauben, Unterseite Modul 2) des ovalen 45°

Spiegels im Modul 2. Nach jeder Verstellung des Spiegels, und damit der Fokusposition, muss eine Korrektur der Probenposition durch verfahren der z-Achse (Refokussierung) erfolgen (Kontrolle über Beobachtungsoptik).

5. Bei maximaler Signalstärke (NL) kann die Abschwächung durch den variablen Abschwächer schrittweise erhöht werden.
6. Die Justierung wird nun ab Punkt 6 (Fokusposition, nachfolgende Korrektur der Probenposition) wiederholt, um sich dem Signaloptymum bei minimalem Fokusburchmesser zu nähern (Kontrolle über Beobachtungsoptik und NL).
7. Ab einer Abschwächung von mindestens 100 steps am variablen Abschwächer werden die in der Farbstoffschicht erzeugten Brennflecke mikroskopisch überprüft und vermessen.
8. Die Justierung ist ausreichend wenn bei einer Brennfleckgröße von etwa  $2 \times 4 \mu\text{m}$  das NL der LTQ im Fullscan-Messmodus ( $m/z$  150-2000 Da) bei  $5 \times 10^1$  liegt.

#### 5.1.5 Zusammenhang der Blenden- und Probenellerspannung

Um Optimalwerte der Blenden- und Probenellerspannung der neuen AP- SMALDI Ionenquelle herauszufinden, wurden mehrere Messreihen am Aufbau mit einstufiger Voroptik durchgeführt. Dabei wurde die Tubelens Spannung (125 V), die Kapillarspannung (25,6 V), die variable Abschwächung (115 steps) und die Anzahl der Laserpulse ( $n = 20$ ) während der Messreihen konstant gehalten. Variiert wurde die Spannung der elektrostatischen Ionenblende (Blendenspannung: 100-300 V in 20 V Schritten) und die Probenellerspannung (1000-3000 V in 50 V Schritten). Der Probeneller bewegte sich dabei mit 200 steps/sec., so dass für jeden neuen, einzelnen Laserpuls eine frische Probenstelle zur Desorption/Ionisation zur Verfügung stand. Das Ergebnis ist in Abbildung 5.6 (S.110) dargestellt.



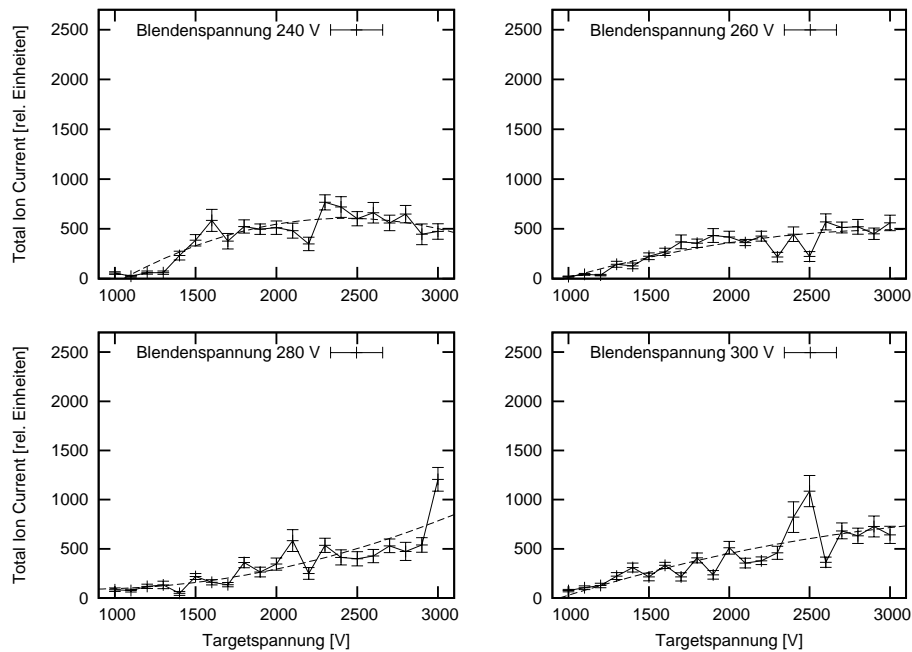


Abbildung 5.6: Charakterisierung der Blenden und Probenzellenspannung (einstufiger Aufbau)

Signalintensitäts-Entwicklung (NL des LTQ MS) während Farbstoffmessungen. Es wurden Messungen (Einzelschussspektren) bei jeweils konstanter Blendenspannung unter Variation der Probenzellenspannung durchgeführt. Die Blendenspannung wurde von 100-300 V in 20 V Schritten erhöht, die Probenzellenspannung von 1000-3000 V in 50 V Schritten. Die Messungen fanden am Messaufbau mit einstufiger Voroptik statt. Tubelens Spannung: 125 V, Kapillarspannung: 25,6 V. Als Messfehler ist der Standardfehler des Mittelwertes ( $n = 20$ ) dargestellt. Die gestrichelten Linien zeigen jeweils den *least-square fit* nach  $f(x)=ax^2+bx+c$  (gnuplot, Vers.4.2.6).

In den Diagrammen ist neben dem jeweiligen Standardfehler des Mittelwertes eine angepasste Ausgleichsfunktion dargestellt ( $f(x)=ax^2+bx+c$ , *least-square fit*, gnuplot, Vers.4.2.6). Als Ergebnis ergibt sich ein uneinheitliches Bild bei Betrachtung aller Diagramme. Die angepassten Ausgleichsfunktionen zeigen exponentiell steigende, linear steigende und gesättigte Entwicklungen der Signalintensitäten. Insgesamt ist bei steigender Blendenspannung ein Abfall der Signalintensität festzustellen. Dies zeigt sich deutlich bei über 160 V Blendenspannung. Andererseits wird die Schwankungsbreite (Standardfehler) kleiner, was auf ein stabileres Ionensignal hindeutet. Interessant ist der Signalverlauf bei 0 V Blendenspannung. Bei recht starken Signalschwankungen können je-



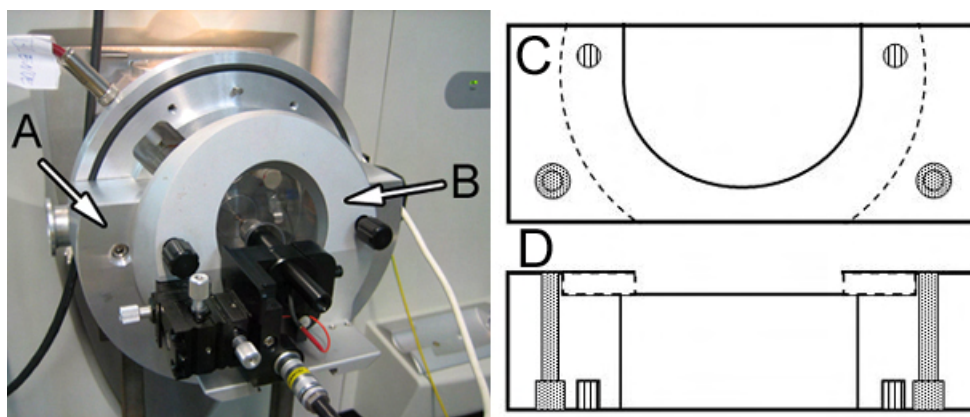


Abbildung 5.7: Hilfskonstruktion zur nESI Kalibrierung des *Finnigan* LTQ-FT MS (Foto, Schemazeichnung)

Die Fotografie (links) zeigt den neu entwickelten Adapterring (A) sowie den Mikromanipulator der Standard nESI Ionenquelle (B). (C) Schematische Frontansicht mit Fräsarbeiten (gestrichelte Linie), Gewindebohrungen (liniert) und durchgehenden Bohrungen (gepunktet). (D) Schematische Aufsicht.

doch auch die höchsten Signalintensitäten beobachtet werden. Die Funktion der elektrostatischen Ionenblende wird dadurch unklar. Dahingegen ist, unabhängig von der Blendenspannung, bei steigender Spannung des Probenhalters eine kontinuierliche Steigerung des Ionensignals erkennbar.

### 5.1.6 nESI Kalibrierhilfe für die AP-SMALDI Ionenquelle am *Finnigan* LTQ-FT

Die instrumentelle Erweiterung des Aufbaus der neuen AP-SMALDI Ionenquelle, durch die Entwicklung eines Adaptersystems mit dem ein Standard nESI Interface an das Modul 2 angebracht werden kann, entfällt die stets nötige erneute Justierung der AP-SMALDI Ionenquelle nach einer Kalibrierung (siehe Abb.5.7, S.111).

Da lediglich das Modul 3 entfernt werden muss, was keinerlei Problem in Bezug auf die Justierung der AP-SMALDI Ionenquelle darstellt, ist die resultierende Zeitersparnis immens. Es müssen weder Bauteile repositioniert noch langwierige Signalsoptimierungen durchgeführt werden. Durch die Kalibrierhilfe wird, im Vergleich zum Standard nESI Interface des Herstellers, ein etwas niedrigeres jedoch stabileres Ionensignal erzielt. Durch den Adapteraufbau wird ein Vergleich des Ionensignals des original nESI Interface mit dem des adaptierten nESI Interface bzw. von Imaging Messungen möglich.

### 5.1.7 Integrierter Steuerkreis für die rasternde massenspektrometrische Untersuchung

Um rasternde Messungen am LTQ-FT durchführen zu können bedarf es einer zeitlichen Koordination der relevanten Systeme (MS, Laser, Laserenergieregulation, Probenpositionierung). Folgende Ereignisse müssen koordiniert werden:

- Positionierung der Probe,
- Triggerung von MS und Laser,
- Nachfolgende Öffnung der linearen Ionenfalle des MS und zeitverzögerte ein- bis siebenfache Emission des Lasers,
- Schließen der linearen Ionenfalle und Massenanalyse,
- Datenverarbeitung und -speicherung
- Signal des MS nach Extern: „Erneut bereit zur Messung“,
- Verfahren der Probe auf die nächste zu analysierende Position.

Um die o.g. Prozesse koordinieren zu können wurde eine spezielle Hardware (USB-Controller) und ein Steuerprogramm (Master control program, MCP) entwickelt. Der USB-Controller wird dabei vom Steuer-PC via USB-Bus angesteuert, auf dem das MCP Programm läuft. Das Signal wird im USB-Controller gesplittet und triggert: 1) unverzüglich das LTQ MS, 2) verzögert den Laser. Die Verzögerung kann über ein Potentiometer eingestellt werden (aktuell 80 ms). Das verzögerte Triggersignal kann bis zu sieben Laserpulse auslösen (Pulsanzahl über Binärschalter am USB-Controller wählbar). Das LTQ MS besitzt interne Steuerrelais, die normalerweise lediglich einem einmaligen Kontaktschluss zu Beginn eines LC-MS Laufes dienen. Durch eine Software Ergänzung des LTQ Tune (Patches) konnten diese Relais zur permanenten externen Triggerung verwendet werden (siehe Kapitel 5.1.7.3, S.118). Dadurch wurde eine Synchronisation des MS Messablaufs mit den Prozessen der externen Komponenten möglich (siehe Abb. 5.8, S.113). Von den externen Steuerrelais wurde das „Start-in“ Relais und das „Ready-out“ Relais genutzt. Die Ansteuerung des „Start-in“ Relais erfolgte elektrisch, das „Ready-out“ Relais wurde mittels Optokoppler modifiziert und somit optisch ausgelesen. Der USB-Controller wurde so konzipiert, dass das „Ready-out“ Signal verarbeitet wird. Um die Prellzeit des Relais zu kompensieren wurde in das MCP eine „Sleep-after-trig“ implementiert (Wert: 200 ms). Somit ist der Controller erst nach dieser Zeit wieder „aufmerksam“ für die Rückmeldung des MS.

Die durch den verzögert abgefeuerten Laser erzeugten Ionen werden in der mindestens 450 ms geöffneten Ionenfalle gesammelt und analysiert. Im *handshake LTQ*-Modus des MCP (siehe Kapitel 5.1.7.2, S.114) wird über die Messgeschwindigkeit der Ionenfalle (IT + weitere Prozesse) direkt die Analysegeschwindigkeit vorgegeben, da das MCP die nächste Messung dann anstößt, wenn die LTQ wieder bereit zur nächsten Messung ist. Dabei konnte festgestellt werden, dass bei Messungen mit externer Triggerung und einer Frequenz von mehr als 2,2 Hz die Gefahr besteht, dass Messungen durch das hier verwendete MS ausgelassen werden. Deshalb musste für den *handshake LTQ*-Modus eine ausreichend lange IT gewählt werden, um die Messfrequenz >2,2 Hz zu halten. Bei Messungen im Multischussmodus war eine verlängerte IT ohnehin nötig, um die durch mehrere Laserpulse erzeugten Ionen in der Ionenfalle sammeln zu können. Nach Rückmeldung des MS an den USB-Controller bzw. an das MCP („Ready-out“ Signal) wird die Probe automatisch zur nächsten Messposition verfahren und eine neue Messung angestoßen.

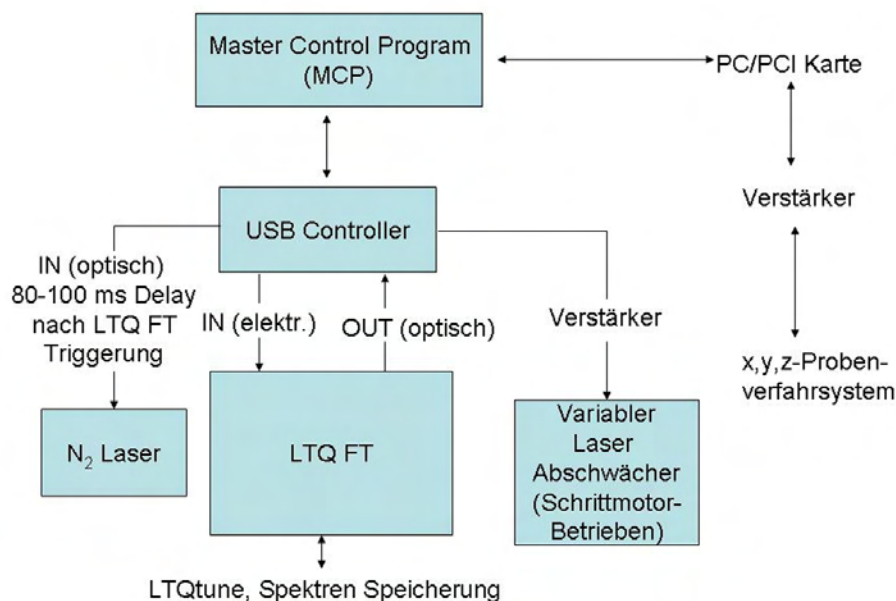


Abbildung 5.8: Steuerkreis des AP-SMALDI Aufbaus

Übersicht über den Steuerkreis (Hardware/Software) der neuen AP-SMALDI Ionenquelle zur Durchführung rasternder Untersuchungen am *Finnigan LTQ-FT MS*.

Ein Zugriff auf die Kernkomponenten des MS bzw. des LTQtune, also ein direkter steuernder Zugriff, war zu keinem Zeitpunkt möglich, was jedoch zur Entwicklung einer flexiblen, externen Steuerung für rasternde Untersuchungen führte.

#### 5.1.7.1 USB Controller – Mikrokontrolleraufbau zur externen Triggerung

Eine der wichtigsten Komponenten zur Durchführung rasternder Untersuchungen am LTQ-FT ist der USB-Controller. Der Weg über die Eigenentwicklung dieses Interface macht den gesamten Aufbau weitgehend von Systemwechseln unabhängig und ermöglicht einen direkteren Zugriff. Die Kernkomponente des USB-Controllers ist ein Mikroprozessor mit eigenem Betriebssystem auf EEPROM. Der USB-Controller ist mit einem Steuer-PC verbunden (siehe Abb.5.9, S.115). Hierzu muss ein Treiber (EZUSB Treiber) auf dem PC installiert sein. Im Controller sind insgesamt drei Platinen über ein Buskabel miteinander verbunden.

1. Platine: Hauptplatine des Mikroprozessors (Anschluss des USB Kabels zum Steuer-PC, TTL Puls über Systembus an zweite Platine).
2. Platine: empfängt Startimpuls des Mikroprozessors und teilt das Signal auf: 1) unverzögert, elektronisch als Startsignal an MS (Start-in), 2) verzögert, optisch an N<sub>2</sub>-Laser (Verzögerung einstellbar über Potentiometer, Oszilloskop kontrolliert). Über einen Binärschalter kann die Anzahl der in Folge emittierten Laserpulse (max. 7) eingestellt werden (Abstand zwischen den Laserpulsen wird über zweites Potentiometer eingestellt, Oszilloskop kontrolliert; 20 Hz Laser = mind. 50 ms Abstand).
3. Platine: serielle Schnittstelle (Einstellung des variablen Abschwächers unter Mithilfe einer Verstärkerendstufe), optische Rückmeldung des MS (Optokoppler-Signal des „Ready-out“ Relais), optionale elektronische Rückmeldung des Lasers über Emissionsereignis (nicht implementiert in MCP).

#### 5.1.7.2 Integrierendes Steuerprogramm – Master Control Program (MCP)

Das Steuerprogramm zur Integration und Koordination der Abläufe der rasternden MS Untersuchung interagiert mit dem USB-Controller und weist folgende Funktionalitäten auf (siehe auch Abb.5.10, S.117)

- Steuerung des x,y,z-Probenverfahrersystems
  - Lineare Bewegung durch Steuerung über Bildschirmsymbole in x-,y- und z-Richtung.
  - Automatische/rasternde Bewegung in Form eines Z- oder S-Schemas.

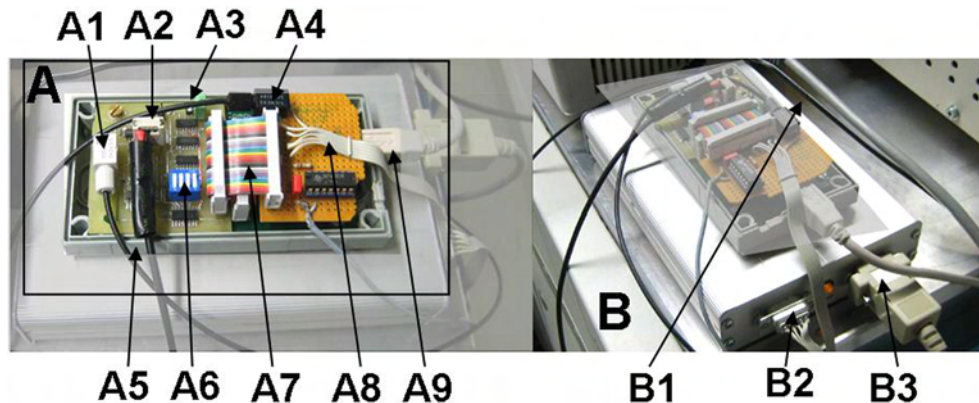


Abbildung 5.9: USB-Controller

Aufsicht des USB-Controllers (A, schwarz umrahmt) und schräge Seitenansicht der Verstärkerendstufe (B, USB-Controller grau ausgeblendet). (A) Die Platine des Mikroprozessors befindet sich unter den beiden sichtbaren Platinen (A1 = Optokoppler zur Triggerung des Lasers, A2 = Potentiometerschraube (Laserverzögerung nach Primärtriggerung), A3 = Potentiometerschraube (Pulsabstand bei mehrfachen Laserpulsen), A4 = Rückmeldung MS über Optokoppler, A5 = elektronische Triggerung des MS, A6 = Binärschalter (Anzahl der mehrfachen Laserpulsen), A7 = Flachbandkabel (Systembus, Platinenverbindung), A8 = serielle Schnittstelle (Ansteuerung der Endstufe des variablen Abschwächers), A9 = USB Anschluss Steuer-PC). (B) Verstärkerendstufe für den Schrittmotor des variablen Abschwächers (B1 = Stromversorgung der Endstufe über Universalnetzteil, B2 = Eingang und B3 = Ausgang zum Schrittmotor (seriell, D-SUB, 9polig)).

- Die Verfahrriichtung kann softwaregestützt invertiert werden.
- *fixed-steps*-Funktion bei linearer Bewegung (direkte Eingabe einer Endposition, z.B. verfahren um 10000 steps in x-Richtung).
- Eingabe der Größe der Hysterese-Kompensation (engl.: *backlash compensation*, bei Richtungswechsel während der rasternden Untersuchung).
- Speicherung/Abruf einer Basis-Position (engl.: *homing position*).
- Eingabe der Verfahrgeschwindigkeit ([steps/Sek.]; Richtwerte: 200-300 steps/Sek. (lineare Bewegung) und 2000 steps/Sek. (rasternde Bewegung), Maximalwert 10000 steps/Sek.).
- Eingabe der Untersuchungsfeldgröße über Pixelanzahl (z.B. 5×6 Pixel) und die jeweiligen steps/Pixel (1 step = 0,12406  $\mu\text{m}$ ).
- Steuerung des variablen Abschwächers
  - 0 steps = 90° zur optischen Achse („Min“).
  - 160 steps = 45° zur optischen Achse („Max“).
  - Die Randwerte („Min“/„Max“) können über den Registrierungseditor

(Eingabeaufforderung: regedit) in Windows eingegeben und gespeichert werden (regedit → MCP → maximum steps).

- MCP ruft die Randwerte über die „Min“/„Max“-Symbole ab (siehe online Hilfe MCP).

- Triggerung MS/Laser

- Bei linearer Probenbewegung sind Triggerung und Bewegungssteuerung unabhängig voneinander möglich (sowohl bei Triggerung im *handshake LTQ*-Modus oder mit Festfrequenz). Beim *handshake LTQ*-Modus wartet der USB-Controller auf das „Ready-out“ Signal des MS und triggert dann automatisch die nächste Messung. Hierbei ist die *sleep after trigger* Zeit wichtig. Der USB-Controller deaktiviert in dieser Zeit (200 ms) den Eingang für das „Ready Out“ Signal des MS. Die Prellzeit des „Ready-out“ Relais bleibt somit wirkungslos auf eine vorschnelle Reaktion des USB-Controllers.

- Im *handshake LTQ*-Modus muss die IT ausreichend lange gewählt werden um >2,2 Hz Analysefrequenz zu bleiben.

- Bei rasternder Untersuchung werden Probenbewegung und Triggerung konzertiert gesteuert (Triggerung im *handshake LTQ*-Modus), Pixelanzahl in x- und y-Richtung sind einzugeben (Größe des zu rasternden Probenareals).

Um diese Funktionalitäten nutzen zu können, müssen einige ergänzende Softwareinstallationen durchgeführt werden:

- Um das x,y,z-Probenverfahrensystem ansprechen zu können, muss zunächst Treibersoftware für die Achsen Steuer-PCI-Karte (PCI-7344) zur Verfügung gestellt werden (Software: National Instruments, NI-Motion für Windows 2000/XP/Me/9x). NI-Motion ermöglicht zusätzlich Werte für Achsbeschleunigung und Bremsverhalten sowie eine große Anzahl weiterer Regelparameter einzustellen. Eingabefelder hierfür sind nicht in die Oberfläche des MCP implementiert.
- Die Datei „LTQ\_NationalInstruments\_MC4SA.umd“ muss sich im gleichen Verzeichnis wie die Datei „MCP.exe“ befinden.
- Die Datei „borlndmm.dll“ muss sich ebenfalls im gleichen Verzeichnis wie die Datei „MCP.exe“ befinden. Alternativ kann Borland-Delphi 2006 installiert werden.

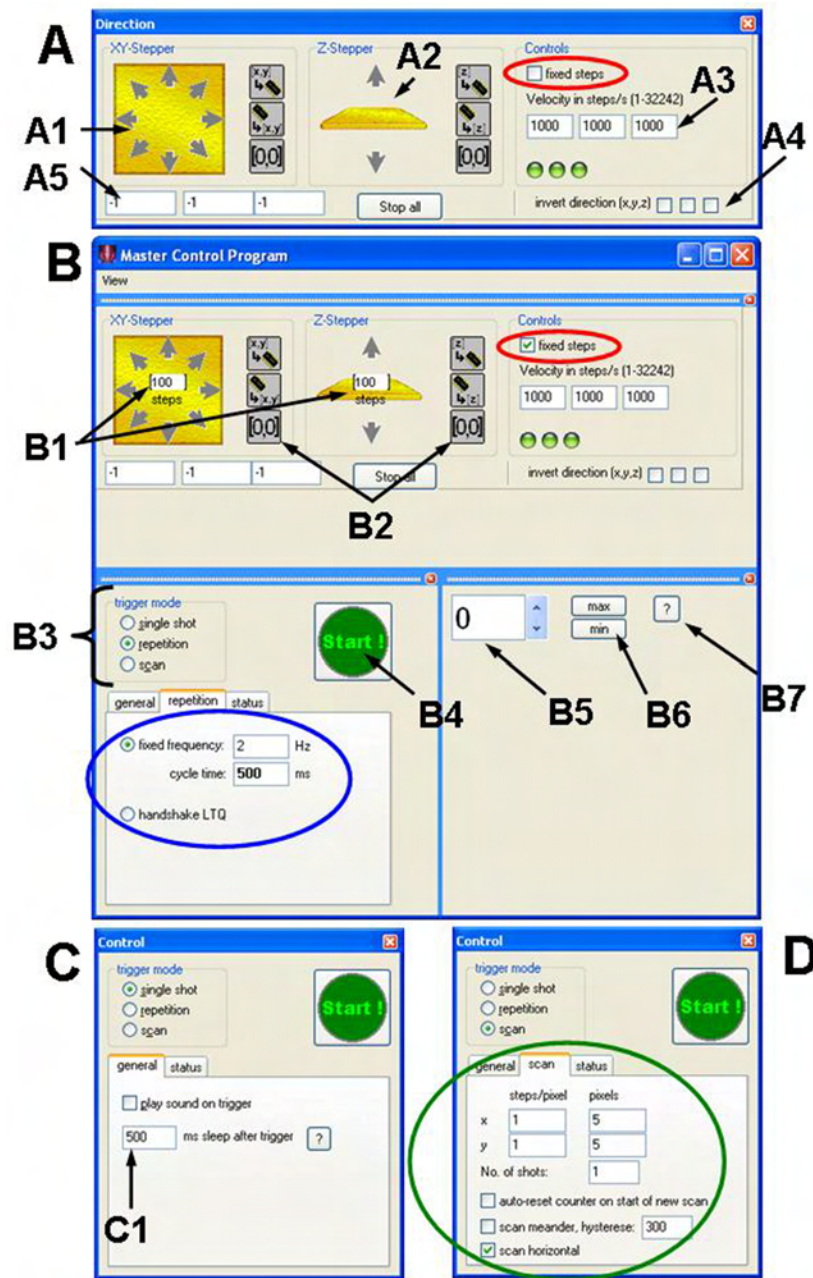


Abbildung 5.10: Master Control Program – MCP

Screenshots des MCP. Es werden unterschiedliche Funktionalitäten und Betriebsmodi des Programms gezeigt. (A) Manuelle Bewegungssteuerung x,y,z-Probenverfahrensystem (A1 = Steuerung in x- und y-Richtung, A2 = Steuerung in z-Richtung, A3 = Eingabe der Verfahrensgeschwindigkeit ([steps/Sek.]), A4 = Invertierung der Bewegungsrichtung, A5 = Positionsanzeige der Probe (1 Sek. Aktualisierungsintervalle)). (B1) Bewegungssteuerung über Endpunkteingabe (rotes Oval). (B2) Speicherung/Abruf *homing position*. (B3) Auswahl des Untersuchungsmodus. (B4) Start/Stop der Untersuchung. (B5-7) Steuerung und Positionsanzeige variabler Abschwächer. (C1) Eingabe *sleep after trig*-Zeit. (D) Eingabefelder der rasternden Untersuchung (grünes Oval: Anzahl Pixel in x- und y-Richtung und Pixelgröße, Z- oder S-Rasterschema, *backlash*-Kompensation).



### 5.1.7.3 Externe Triggerung: Patches zur soft-/hardwareseitigen Befähigung des Massenspektrometers

Wie bereits im Kapitel 5.1.7 (S.112) beschrieben, sind am LTQ-FT Relais zur externen Steuerung vorgesehen. Sie dienen jedoch normalerweise einer LC-MS Kopplung. Die HPLC signalisiert dabei, durch einmaligen Kontaktschluss, den Beginn des LC Laufes. Ein einmaliger Kontaktschluss hätte zur permanenten externen Steuerung/Triggerung des MS nicht ausgereicht. Deshalb wurden von Thermo Scientific sogenannte Patches (\*.ICB Dateien) erstellt, die die permanente externe Triggerung des LTQ-FT via „Start-in“-Relais ermöglichen. Drei \*.ICB Dateien müssen hierzu geändert werden (toggle.ICB, takeascan.ICB und setmode.ICB). Die Dateien befinden sich im Verzeichnis:

C:\Xcalibur\system\ltq\ITCL\\*.ICB.

Beim booten werden diese Dateien vom Steuer-PC, auf dem LTQTune läuft, an den internen LTQ-FT Rechner übergeben. Nach Übergabe der Dateien muss der sogenannte „experimental mode“ am MS aktiviert werden (LTQTune → Diagnostics → Tools → Toggles → Spare1). Nach Aktivierung des „Spare1“ Schalters muss, eine korrekte Vorgehensweise vorausgesetzt, die Bestätigung „Scantrigger Experimental enabled“ im Statusfenster erscheinen. Ebenso wird die Deaktivierung „Scantrigger Experimental disabled“ bestätigt.

### 5.1.8 Zweistufige Voroptik der AP-SMALDI Ionenquelle (Teleskopoptik)

Neben dem einstufigen optischen Aufbau, mit nur einer bikonvexen Vorfokussierlinse, wurde ein zweistufiger optischer Aufbau, mit zwei bikonvexen Vorfokussierlinsen, untersucht. Die zweite bikonvexe Linse ( $L_2$ ), befindet sich direkt oberhalb des Quarzfensters im Modul 2.

Der vom Modul 1 kommende, divergente Laserstrahl trifft zunächst auf  $L_2$ , durch die dieser konvergent wird. Der weitere Verlauf des Laserstrahls ist identisch zu dem im einstufigen Aufbau. Die Teleskopoptik besteht aus  $L_1$  ( $f = 25\text{ mm}$ ;  $21,4\text{ mm } \varnothing$ ) und  $L_2$  ( $f = 240\text{ mm}$ ;  $50\text{ mm } \varnothing$ ). Die Linsen befinden sich in einem Abstand von  $d = 290\text{ mm}$  zueinander ( $d > f_1 + f_2$ ). Auf das Objektiv trifft ein konvergierender Laserstrahl. Gleichung 5.1 dient der Berechnung der Lage des Brennpunktes zweier aufeinander folgender Linsen in Abhängigkeit von ihrem Abstand.

$$\frac{1}{f_G} = \frac{1}{f_1} + \frac{1}{f_2} - \frac{d}{f_1 f_2} \quad (5.1)$$

$f_G$  = resultierende Gesamtbrennweite,  $f_1$  = Brennweite  $L_1$ ,



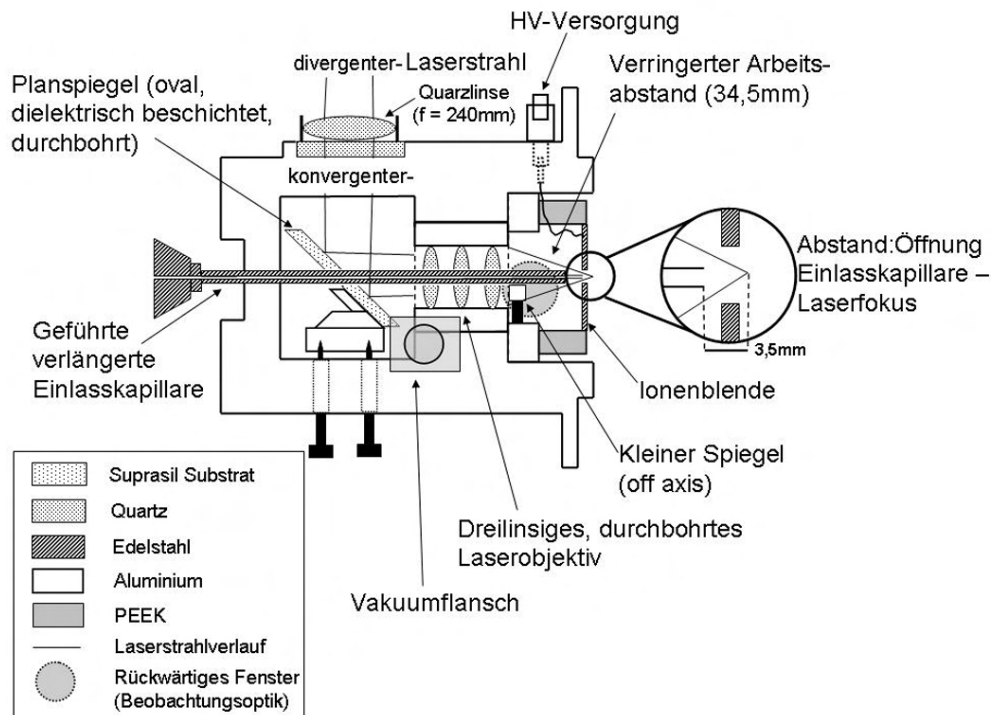


Abbildung 5.11: Modul 2 als Teleskopaufbau

Verlauf des Laserstrahls und Anordnung der optischen und ionenoptischen Komponenten im Modul 2 (Seitenansicht). Zusätzlich ist eine Quarzlinse ( $f = 240 \text{ mm}$ ) oberhalb des Quarzfensters installiert, die den auftreffenden divergenten Laserstrahl konvergiert. Der weitere Verlauf des Laserstrahls ist identisch mit dem im einstufigen Aufbau. Der Abstand des Laserfokus beträgt jedoch nun  $34,5 \text{ mm}$  zum Objektiv (Abstand der Einlassöffnung der verlängerten Ionenentransferkapillare zum Laserfokus =  $3,5 \text{ mm}$ ). Vier verkürzte PEEK-Stäbe positionieren die Ionenblende.

$$f_2 = \text{Brennweite } L_2, d = \text{Abstand der Linsen } (L_1 \text{ und } L_2)$$

Das Ergebnis ist eine Gesamtbrennweite ( $L_1$  und  $L_2$ ) von  $f_G = -244 \text{ mm}$ . Der Brennpunkt des Laserobjektivs rückt, durch Veränderung des Winkels des auftreffenden Laserstrahls, um  $5,5 \text{ mm}$  näher an das Objektiv heran. Der Brennpunkt weist nun einen Abstand von  $34,5 \text{ mm}$  zum Objektiv auf. Gleichzeitig verringert sich der Abstand zwischen der Öffnung der verlängerten Ionenentransferkapillare und dem Laserfokus um  $2,3 \text{ mm}$  auf  $3,5 \text{ mm}$  (siehe Abb. 5.11, S. 119). Die Beobachtungsoptik wurde, bedingt durch die neue Lage des Laserfokus, repositioniert.

**5.1.8.0.1 Ionenoptischer Aufbau** Der ionenoptische Aufbau der Teleskopvariante der AP-SMALDI Ionenquelle entspricht grundsätzlich dem des einstufigen Aufbaus (gleiche Anordnung der Komponenten). Die elektrostatische

Ionenblende befindet sich jedoch näher am Laserobjektiv und die verlängerte Ionentransferkapillare wurde gekürzt. Zur Neupositionierung der Blende wurden vier neue PEEK Stifte gefertigt (Gesamtlänge 42,5 mm). Der Abstand zwischen Laserobjektiv (Vorderkante Fassung) und der Hinterkante der Ionenblende beträgt nun 32,5 mm.

**5.1.8.0.2 Ionentransferkapillare** Die verlängerte Ionentransferkapillare entspricht in ihrem grundsätzlichen Aufbau der des einstufigen Aufbaus (siehe Kapitel 5.3, S.104), wurde jedoch auf eine Gesamtlänge von 225,5 mm gekürzt (96,25 mm innerhalb des MS; 127,25 mm außerhalb des MS).

### 5.1.9 Ergebniszusammenfassung – Apparative Ergebnisse

Die neue AP-SMALDI Ionenquelle besteht aus drei Modulen. Der modulare Aufbau und der Betrieb unter Atmosphärendruckbedingungen ermöglichen einen schnellen Probenwechsel. Ein Betrieb unter Vorvakuum wurde jedoch vorgesehen. Modul 1 umfasst den Desorptions-/Ionisationslaser, mehrere Umlenkspiegel, Abschwächer (Regulation der Bestrahlungsstärke) und eine Vorfokussierlinse. Alle Komponenten befinden sich auf einer massiven Aluminiumplatte. Modul 2 besteht aus einem Aluminiumgehäuse in dem sich ein großer ovaler Planspiegel, das mehrlinsige Laserobjektiv und die elektrostatische Ionenblende befinden. Planspiegel und Laserobjektiv sind durchbohrt. Des Weiteren trägt das Modul 2 die Optik zur Beobachtung der Probe sowie Anschlüsse zur Hochspannungsversorgung. Modul 3 wird am Modul 2 befestigt und trägt den x,y,z-Probenverfahrtisch zur exakten Probenpositionierung. Als wichtige Hardwarekomponente kommt ein innerhalb des Instituts entwickelter USB-Controller hinzu. Der USB-Controller wird über ein Steuerprogramm (MCP) kontrolliert und ist in der Lage: 1) den Schrittmotor des variablen Abschwächers zu steuern, 2) den Desorptions-/Ionisationslaser zu triggern und 3) zur Triggerung/Statusabfrage des MS. Das MCP bildet softwareseitig die Basis für rasternde Untersuchungen und koordiniert mit Hilfe des USB-Controllers die Vorgänge während der rasternden Untersuchung. Zur externen Triggerung des MS sind sogenannte Patches (\*.ICB files) von Seiten des Herstellers nötig. Die Patches ermöglichen die permanente, externe Triggerung des MS über spezielle, extern zugängliche Relais am LTQ MS. Damit ist eine Steuerkreis geschaffen, der die exakte Untersuchung von bis zu 50×50 mm großen Probenträgern ermöglicht. Die Anzahl und der Abstand der Laserpulse pro Probenposition können manuell (Binärschalter) und softwarebasiert (MCP) kontrolliert werden. Die entstehenden Ionen werden durch eine speziell angefertigte, verlängerte

Ionentransferkapillare in das MS geleitet. Zur Vermeidung häufiger Justierungen der AP-SMALDI Ionenquelle, z.B. nach Kalibrierung des FT-ICR Massenanalysators, welche jeweils den Abbau der AP-SMALDI Ionenquelle nötig machte, wurde eine Kalibrierhilfe entwickelt. Mit deren Hilfe muss lediglich das Modul 3 zur Kalibrierung entfernt werden, was zu keinerlei Dejustierung der AP-SMALDI Ionenquelle und somit der Laserfokusposition führt.

## 5.2 Diskussion der Apparativen Ergebnisse (Hardware und Software)

**Mechanik:** Die neue AP-SMALDI Ionenquelle verbindet verschiedene Eigenschaften miteinander, wie die Möglichkeit zum schnellen Probenwechsel und die einfache Ankoppelbarkeit an das MS, in diesem Fall das *Finnigan* LTQ-FT. Die Ionenquelle ermöglicht eine einfache Betätigung der laseroptischen Bauteile und ermöglicht die Verwendung unterschiedlich großer Probenträger. Die Ankopplung der AP-SMALDI Ionenquelle an die Front des LTQ MS und der Wechsel der Probe sind reproduzierbar und einfach durchzuführen. Die Ankopplung erfordert jedoch etwas Übung und Fingerspitzengefühl, da die verlängerte Ionentransferkapillare bereits am beheizbaren Konus der LTQ montiert sein muss bevor Modul 2 montiert wird. Das Modul 2 wird auf diese „aufgefädelt“. Dabei muss vorsichtig vorgegangen werden, da die Kapillare sowohl den durchbohrten, ovalen 45° Spiegel, als auch das durchbohrte Objektiv „durchstößt“. Bei Verkantung besteht die Gefahr beide optischen Bauteile zu beschädigen. Eine große Unterstützung bei diesem Vorgang bringt ein höhenverstellbares Stahlgestell, dass das Modul 2 während der Ankopplung und auch später stützt. Da die Probenhalterung durch einen starken Permanentmagneten gewährleistet wird, ist der einfache Wechsel der Proben sichergestellt. Auch nicht-Eisenmetall Probenträger können verwendet werden, da diese zunächst in einer adaptierenden Stahlbasisplatte befestigt werden. Alle in den Modulen 1 und 2 befindlichen laseroptischen und beobachtungsoptischen Bauteile können präzise manipuliert werden, da sie auf speziellen optischen Halterungen aufgebracht sind. Das Modul 3 wurde so dimensioniert, dass Probenträger bis zu einer maximalen Größe von 54×36 mm problemlos untersucht werden können.

**Laserjustierung:** Die Justierung und Ausrichtung des Laserstrahls im Modul 1 ist, wie schon erwähnt, durch die Verwendung optischer Halterungen einfach und leicht kontrollierbar. Auch ist die Justierung des 45° Spiegels im Modul 2, bedingt durch eine speziell hierfür entwickelte Dreipunkt-Spiegelhalterung,

robust und einfach. Die Dreipunkt-Spiegelhalterung dient auch unmittelbar der Positionierung und Zentrierung des Laserfokus vor der Öffnung der verlängerten Iontentransferkapillare. Die Justierungsprozedur ist in Kapitel 5.1.4 (S.107) beschrieben. Nichts desto trotz erfordert die Justierung einige Zeit, Geschicklichkeit und Übung. Eine mechanische Justierhilfe wäre hilfreich, aber nur unter großem feinmechanischem Aufwand herzustellen. Zusätzlich erschweren unterschiedliche Aspekte die Verankerung einer solchen Justierhilfe. Hierzu zählt, dass sich die Position der verlängerten Iontentransferkapillare bei jeder Montage leicht verändert und nicht fest mit dem Modul 2 verbunden ist. Der Laserfokus muss deshalb in jedem Fall nach der erneuten Anbringung der AP-SMALDI Ionenquelle repositioniert werden. Da sich die Positionsveränderungen im Mikrometerbereich bewegen, befindet man sich an den Grenzen feinmechanischer Genauigkeit. Es wurde deshalb die Justierung über den beschriebenen Weg der manuellen, stufenweisen Signalsoptimierung vorgezogen.

Bei der Justierung des Laserfokus mittels  $45^\circ$  Spiegel, bei gleichzeitiger Optimierung des Ionensignals am laufenden LTQ MS, müssen mehrere Dinge beachtet werden:

- Verändert man die x- und y-Position des Laserfokus ändert man auch die Lage in z-Richtung.
- Durch die räumlich begrenzte Ausdehnung des Laserfokus (Rayleigh Länge,  $\approx 40 \mu\text{m}$ ; siehe Kapitel 3.2.1, S.16) zieht dies Veränderungen der Signalintensität nach sich. Diese kann durch Defokussierung oder die Änderung der Lage des Laserfokus bedingt sein.
- Um welchen der beiden Faktoren es sich handelt ist durch Refokussierung (Veränderung der z-Position der Probe) zu ermitteln.
- Der Veränderung der Lage in x- und y-Richtung muss also zunächst immer eine z-Repositionierung, bei gleichzeitiger Kontrolle der Intensität des Ionensignals (NL) folgen, bevor eine erneute x-y-Positionierung zur weiteren Optimierung erfolgen kann.

**Verlängerte Iontentransferkapillare und elektrostatische Ionenblende:** Die verlängerte Iontentransferkapillare (siehe Kapitel 5.1.2.2.1, S.102) ist eine unkonventionelle und vergleichsweise simple Lösung, um weit entfernt von der Einlassöffnung des MS entstehende Ionen zur Massenanalyse zu transportieren. Der Mechanismus, der zur Aufnahme der Ionen in die Kapillaröffnung führt, ist jedoch nicht vollends geklärt. Es könnten elektrostatische oder eher konvektive Kräfte ausschlaggebend sein. Wie die Ergebnisse in Kapitel 5.1.5

(S.108) zeigen, ergibt sich kein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Potential der verwendeten Ionenblende und der am MS beobachteten Signalintensität. Die Grundtendenz deutet auf eine Abnahme der Signalintensität mit Erhöhung der Blendenspannung hin. Ebenso scheint die Ionenblende eine stabilisierende Wirkung auf den Ionenstrom zu haben, jedoch keine maßgebliche Rolle beim Transfer der Ionen zur Kapillaröffnung zu spielen. Inwieweit nun der Gasstrom in das MS, und die dadurch verursachte Konvektion, für den Ionentransport in das MS verantwortlich sind bleibt somit offen. Im Gegensatz hierzu lässt sich für das Potential des Probenhalters ein eindeutiger Zusammenhang erkennen. Eine Potentialsteigerung bewirkt eine direkte Steigerung der Signalintensität.

Um den Anteil der einzelnen Transportkomponenten zum Transfer der Ionen in das MS genauer beurteilen zu können, müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Hierdurch könnte u.U. eine Steigerung des Ionentransports in das MS erzielt werden. Alternativen könnten die Ionenleitung durch eine mehrstufige Einzel-Linse oder einen miniaturisierten Multipol sein. Auch permanente magnetische Fokussierung wäre denkbar (Schollmeier et al., 2008). Ebenso wäre ein Ansatz wie der von Hars möglich, der Ionen entlang eines Druckgradienten, über eine mit helikalen Elektroden umwickelte, isolierende Kapillare (ähnlich einem Dipol, *helical dipole*), leitet (Hars und Meuzelaar, 1997; Hars, 2001). Alle alternativen Lösungen gestalten sich jedoch durch den axialen Aufbau der Laseroptik schwierig. Die maßgebliche Behinderung der Ausbreitung des Desorptions-/Ionisationslasers könnte zum Verlust der hohen lateralen Auflösung, durch Brechung oder Beugung, führen.

**Beobachtungsoptik:** Die 4-fache Vergrößerung der Beobachtungsoptik (siehe Kapitel 5.1.2.3, S.102) ermöglicht eine gute Beobachtung des Untersuchungsobjektes. Die Vergrößerung macht die Probe gut erkennbar, verschafft aber auch einen gewissen Überblick. Der Aufbau der Beobachtungsoptik trägt dabei dem Gesichtspunkt Rechnung, die Ionenquelle auch unter Vakuum betreiben zu können. Deshalb befindet sich lediglich der kleine *off axis* Spiegel innerhalb des Moduls 2. Als Nachteil erweist sich dabei die schwierige Justierung dieses Spiegels, der sich nicht auf einer schwierig verstellbaren Spiegelhalterung befindet. Zudem fällt das Licht der Probe durch die Öffnung der elektrostatischen Ionenblende (2,2 mm Ø) auf den Spiegel. Die Lichtintensität der Probe ist deshalb recht niedrig und auch der Bildausschnitt begrenzt. Die erstmalige Justierung der Beobachtungsoptik ist zeitaufwendig, da der Lichtweg sehr viele rechte Winkel aufweist. Ist jedoch die Erstjustierung erfolgt, können weitere Optimierungen über die außerhalb des Modul 2 liegenden Spiegel vorgenommen werden.

Dies ist komfortabel durchführbar. Die Beleuchtung wurde mittels einer Schwanenhalslampe bewerkstelligt. Deren Lichtstrahl wurde parallel zum Laserstrahl, auf dem Weg von Modul 1 zu Modul 2, senkrecht nach unten eingekoppelt. Ihre Ausrichtung erfordert einige Zeit, um eine möglichst optimale Ausleuchtung des Untersuchungsobjektes zu erzielen. Optimal wäre es die Schwanenhalslampe durch eine direktere Beleuchtung zu ersetzen. Dabei wäre eine im Modul 3 befindliche Beleuchtungsvorrichtung denkbar. Dies ist aber, bedingt durch den kleinen Abstand zwischen Ionenblende und Probenoberfläche (nur etwa 2 mm), nicht einfach zu realisieren. Eine Beleuchtung senkrecht von oben, also in den 2 mm breiten Spalt, könnte lediglich zu einem am Objekt vorbei strahlen führen. Optimaler wären ringförmig um das Quarzfenster auf der Oberseite des Modul 2 oder an der Rückseite des Laserobjektivs angeordnete LEDs.

**Software, USB-Controller und Elektronik:** Wie bereits erwähnt wurde, zur Steuerung der an linearen und rasternden Untersuchungen beteiligten Komponenten, eigens ein Steuerprogramm (MCP) innerhalb des Instituts entwickelt. Das sogenannte *Master control program* (MCP) ist in der Lage, zusammen mit dem USB-Controller und den Patches für die Steuersoftware des MS (siehe Kapitel 5.1.7, S.112ff), die linearen und rasternden Untersuchungen zu steuern. Im Folgenden sollen nochmals kurz, die zur Ablaufsteuerung nötigen Vorgänge zusammengefasst werden:

- Triggerung des Massenspektrometers,
- Triggerung des Lasers,
- Die Möglichkeit ein oder mehrere Einzelschussspektren einer Probenposition aufzunehmen,
- Den x,y,z-Probenverfahrtisch manuell und automatisch zu steuern,
- Ein S- und ein Z-förmiges Scanning-Muster mit individueller backlash Kompensation zu untersuchen,
- Die Verfahrgeschwindigkeit des x,y,z-Probenverfahrtisches einzustellen,
- Die Verfahrrichtung des x,y,z-Probenverfahrtisches ggfs. zu invertieren,
- Eine *homing position* des x,y,z-Probenverfahrtisches zu speichern und abzurufen,
- Die Steuerung des variablen Abschwächers.

Alle Funktionalitäten sind direkt über Symbole oder Eingabefenster in die Bedienoberfläche implementiert. Zusätzliche Funktionalitäten, wie die Eingabe der minimalen und maximalen „Stepperstufe“ des variablen Abschwächers, werden erklärt. Die Bewegungsrichtung des x,y,z-Probenverfahrtisches kann schnell in Geschwindigkeit (steps/sec.) und Richtung eingestellt werden. Durch die Möglichkeit unterschiedliche Modi zur massenspektrometrischen Untersuchung (Triggerung einzelner Massenscans, dauerhafter Betrieb mit fester Frequenz oder im sogenannten *hand shake* LTQ-Modus, automatische rasternde Untersuchung von Probenarealen) wählen zu können, werden unterschiedliche analytische Möglichkeiten eröffnet. Die rasternde Untersuchung kann so den jeweiligen Probenbedingungen und der Fragestellung angepasst werden. Während aller Betriebsmodi kann jeweils die Stellung des variablen Abschwächers verändert und somit die Intensität der Laserbestrahlungsstärke angepasst werden.

Trotz der umfangreichen Funktionalitäten des MCP und der Entwicklungssicherheit durch selbst entwickelte Komponenten bleibt ein Nachteil bestehen. Dieser liegt im fehlenden direkten Zugang zur Steuerelektronik des Massenspektrometers und macht sich gerade bei der Probenuntersuchung durch Einzelschussspektren bemerkbar. Hier könnten deutlich kürzere Analysezeiten, gerade bei Untersuchungen mit dem LTQ MS, erzielt werden. Der externe Zugang limitiert die Analysefrequenz auf maximal 2,2 Hz. Dieser Geschwindigkeitsnachteil fällt bei Multischussspektren, aufgrund der niedrigen Repetitionsrate des verwendeten LTB Lasers (20 Hz), nicht so sehr ins Gewicht, denn bei sieben Laserpulsen pro Probenposition werden mindestens 400 ms IT benötigt, um alle erzeugten Ionen sammeln zu können.

Die Konzeption der AP-SMALDI Ionenquelle, auf der Basis einer externen Triggerung, macht sie jedoch andererseits sehr universell einsetzbar. Alle Massenspektrometer, die eine externe Triggerung vorsehen, könnten damit prinzipiell bedient werden.

Die Steuerung des MS und die Steuerung der MCP Komponenten sollten durch zwei separate Steuerrechner bewerkstelligt werden. Beide Steuerprogramme (LTQTune und MCP) stellen hohe Ansprüche an die Hardware und ein separater Betrieb erhöht die Sicherheit des Scanning-Betriebes.

Der USB-Controller stellt eine einfache und robuste Lösung zur externen Steuerung dar. Zudem beinhaltet dieser eine Hardwarelösung für die Regulation der Zeitabstände zwischen Primärtrigger und Laserverzögerung ( $t_1$ ), sowie dem Abstand zwischen den Laserpulsen bei Multischussspektren ( $t_2$ ). Beide werden über Potentiometer (RC-Schwingkreis), bei gleichzeitiger Kontrolle durch

ein Oszilloskop, eingestellt. Hier wäre eine softwarebasierte Lösung, implementiert in das MCP und somit über den Mikrokontroller, komfortabler gewesen (Programmiersprache: Assembler). Andererseits ist die Einstellung der Potentiometer lediglich bei der Erstinbetriebnahme nötig und die Handhabung bei der gewählten Lösung einfacher. Durch die Verwendung von zwei unabhängigen RC-Schwingkreisen ergibt sich jedoch für die jeweils erste Laseremission ein Jitter von maximal  $t_1+t_2/2$ . Real bedeutet dies, dass die erste Laseremission, bei  $t_1 = 80 \text{ ms}$  und  $t_2 = 50 \text{ ms}$ , zwischen 80 bis 105 ms  $(80+50/2)$  nach dem Primärtrigger erfolgt.

Der Zugang zur Elektronik der externen Steuerrelais des MS wurde so störungsfrei wie möglich gestaltet. Die Triggerung des Massenspektrometers wird elektrisch vollzogen. Die Rückmeldung des Massenspektrometers an den USB-Controller erfolgt optisch (Lichtleiter, Optokoppler), um die Störungsanfälligkeit zu senken. Die Optokoppler sind direkt mit der Relaisplatine verbunden.

**nESI Kalibrierhilfe:** Die nESI Kalibrierhilfe (siehe Abb.5.7, S.111) führte, im Hinblick auf Ab- und Aufbauzeiten sowie Kontinuität von Messeinstellungen, zu deutlichen Vorteilen im Messbetrieb. Die wöchentliche, zeitaufwendige Rejustierung der AP-SMALDI Ionenquelle, nach der Kalibrierung des FT-ICR MS über die direkt installierte nESI Ionenquelle, entfällt. Die Kalibrierhilfe selbst kann innerhalb von wenigen Minuten montiert werden. Interessant für die Verwendung der Kalibrierhilfe ist die zu beobachtende Signalstabilität, im direkten Vergleich zur direkt montierten nESI Ionenquelle des Herstellers. Bei Erhöhung der Signalstabilität ist jedoch eine leicht gesenkte Signalintensität feststellbar. Dennoch führt dies insgesamt dazu, dass bestimmte Abschnitte der semi-automatischen Kalibrierung, die mit der direkt montierten nESI Ionenquelle Probleme bereiteten, mit der nESI Ionenquelle an der Kalibrierhilfe und über die AP-SMALDI Ionenquelle problemlos durchgeführt werden konnten. Während Kalibrierungen mittels Kalibrierhilfe war die elektrostatische Ionenblende der AP-SMALDI Ionenquelle lediglich mit dem ausgeschalteten Netzteil verbunden. Die Beobachtung dieser stabilisierenden Wirkung der Ionenblende, in Verbindung mit dem ausgeschalteten Netzteil, steht wiederum im Widerspruch zur beobachteten Signalentwicklung wie sie in Kapitel 5.1.5 (S.108) dargestellt sind.

**Teleskopoptik:** Ziel der zweistufigen Optik (Teleskopoptik, siehe Kapitel



5.1.8, S.118) ist es, die Empfindlichkeit der AP-SMALDI Ionenquelle, durch Verringerung des Abstands zwischen Laserobjektiv und Laserfokus, zu erhöhen. Zunächst muss man sich jedoch folgendes vergegenwärtigen, um die Motivation dieser Abstandsverringerung verstehen zu können: der aus dem durchbohrten Laserobjektiv austretende Laserstrahl besitzt die Form eines Hohlkegels. Der so geformte Laserstrahl trifft mit seinen Kegelflächen, ab einer bestimmten Länge der Iontentransferkapillare, auf deren Vorderkante und wird dort gebeugt. Die Länge der Kapillare wird dadurch limitiert.

Durch die Verminderung des Abstands zwischen Laserfokus und Objektiv, also einer Verringerung der Länge dieses Hohlkegels, wird demzufolge der Winkel der Innenflächen zueinander steiler. Somit ist es nun möglich mit der Öffnung der Iontentransferkapillare näher an den Laserfokus heranzukommen, bevor Beugung auftritt. Näher am Laserfokus bedeutet auch gleichzeitig näher am Ort der Ionenentstehung. Somit sollte die Ionenausbeute und dementsprechend die Empfindlichkeit der Ionenquelle erhöht werden.

Die Teleskopoptik machte, wie erwartet, die Verringerung des Abstandes zwischen Laserfokus und Einlassöffnung möglich (um 2,3 mm auf 3,5 mm). Dies führte jedoch nicht zu einer Erhöhung der Empfindlichkeit. Der Grund für das Ausbleiben der Empfindlichkeitssteigerung durch die Teleskopoptik könnte eine Änderung der Energieverteilung im Querschnitt des Laserfokus sein. Dieser und andere Gesichtspunkte der Teleskopoptik werden näher innerhalb der experimentellen Ergebnisse diskutiert (siehe Kapitel 5.4, S.136).

**Ausblick – Autofokusvorrichtung der Laseroptik:** Niveauunterschiede und Inhomogenitäten der Probe, u.a. verursacht durch die Oberflächenstruktur und die Probenpräparation, können Intensitätsschwankungen des Ionensignals während MS Untersuchungen bewirken. Da die Längenausdehnung des Laserfokus in z-Richtung durch die Rayleigh-Länge limitiert wird (hier etwa  $40\text{ }\mu\text{m}$ ), führen Niveauunterschiede der Probe in dieser Größenordnung bereits zum Verlassen des Fokusbereichs und damit zu Intensitätsschwankungen (siehe Kapitel 3.2.1, S.16). Tierische Zellen mittlerer Größe befinden sich in dieser Größenordnung. Die Arbeit mit der Ionenquelle könnte deshalb durch die Installation einer Autofokusvorrichtung stark vereinfacht werden. Eine Autofokusvorrichtung könnte direkt auf die Steuerung der x,y,z-Probenverfahrtisches eingreifen und so Defokussierungen im laufenden Betrieb korrigieren. Sowohl während der Justierung als auch bei echten Probenmessungen würden so Niveauunterschiede der Probe automatisch ausgeglichen. Signalinstabilitäten könnten auf das Maß inhomogener Probenpräparation reduziert werden. Eine mögli-

che Funktionsweise einer Autofokusvorrichtung wird bei Fan et al. (2000) und Fan et al. (2003) auf der Basis handelsüblicher Komponenten dargestellt.

**Fazit:** Zusammenfassend kann die neue AP-SMALDI Ionenquelle, im Hinblick auf ihre Verwendung im Analysebetrieb, wie folgt beurteilt werden: einfach handhabbar, jedoch einer gewissen Einarbeitung und Erfahrung bedürftig. Sie gestattet, im Zusammenspiel mit der Steuersoftware LTQTune und MCP sowie dem USB-Controller, die lateral hochauflösende manuelle und automatische Untersuchung von Probenoberflächen an Proben verschiedener Größe. Hierbei können unterschiedliche Betriebsmodi (Einzelschuss, Multischuss), in Abhängigkeit von der Probe, zur Untersuchung gewählt werden.

Die Entwicklung einer nESI Kalibrierhilfe führte zur Reduktion zeitaufwendiger Montagearbeiten und Justierungen der AP-SMALDI Ionenquelle, die sonst wöchentlich, bedingt durch die Kalibrierung des FT-ICR Massenanalysators, anfielen. Somit wurde die Verwendung der neuen Ionenquelle noch komfortabler. Eine weitere Vereinfachung der Handhabung der AP-SMALDI Ionenquelle könnte durch die Installation einer Autofokusvorrichtung, zur automatischen Korrektur einer Defokussierung des Desorptions-/Ionisationslasers, erzielt werden.

### 5.3 Experimentelle Ergebnisse – Optischer Laserfokusedurchmesser, Desorptions-Laserfokusedurchmesser: LDI und SLDI

#### 5.3.1 Optischer Laserfokusedurchmesser

##### 5.3.1.1 Einstufige Voro-optik

Die Charakterisierung der Laseroptik des AP-SMALDI Aufbaus am LTQ-FT mittels *beam-profiling* ergaben, nach dem  $1/e^2$  Kriterium (siehe Kapitel 4.3, S.72), eine Laserfokusgröße von  $\bar{x} = 6,6 \mu\text{m} \pm 0,7 \mu\text{m}$  in x-Richtung und  $\bar{y} = 5,8 \mu\text{m} \pm 0,8 \mu\text{m}$  in y-Richtung. Die Umrechnung auf einen Kreisdurchmesser ergibt  $6,2 \mu\text{m} \pm 0,6 \mu\text{m}$  (siehe Abb.5.12, S.129). Es wurde über 50 Laserpulse gemittelt (Daten: Sabine Günther).

##### 5.3.1.2 Zweistufiger Voro-optik (Teleskopoptik)

Für die zweistufige Voro-optik ergab die laseroptische Vermessung des installierten Aufbaus eine Laserfokusgröße von  $\bar{x} = 15,1 \mu\text{m} \pm 1,4 \mu\text{m}$  in x-Richtung und  $\bar{y}$

$= 8,1 \mu\text{m} \pm 1,1 \mu\text{m}$  in y-Richtung ( $1/e^2$  Kriterium). Ausgedrückt als Kreisdurchmesser ergibt dies  $11,6 \mu\text{m} \pm 1,1 \mu\text{m}$  (siehe Abb.5.13, S.130). Es wurden ebenfalls 50 Laserpulse gemittelt (Daten: Sabine Günther). Der Laserfokus ist damit etwa doppelt so groß wie der der einstufigen Voroptik. Es ist eine Homogenisierung der Energieverteilung im Laserstrahlquerschnitt zu beobachten, erkennbar an der homogenen Farbverteilung der *beam-profiler* Aufnahme. Zudem verlaufen die Flanken flacher. Die Energieänderung mit zunehmender Entfernung vom Zentrum erfolgt deshalb nicht so rasch wie im einstufigen Aufbau.

### 5.3.2 LDI

#### 5.3.2.1 Einstufige Voroptik

**5.3.2.1.1 Effektive Laterale Auflösung:** Wie im Kapitel 3.3.1 (S.20) beschrieben, kann die Leistungsfähigkeit der neuen AP-SMALDI Ionenquelle über den optischen und den Desorptions-Laserfokusbereich (Brennflecken) bestimmt werden. Die mögliche laterale Auflösung soll über den Desorptions-Laserfokusbereich, also anhand der beobachteten Brennflecken (Ablations-/Desorptionsorte) auf der Probe, näher charakterisiert werden. Dies ermöglicht die direkte Korrelation zwischen der Größe der Brennflecken auf der Probe und der beobachteten Signalintensität.

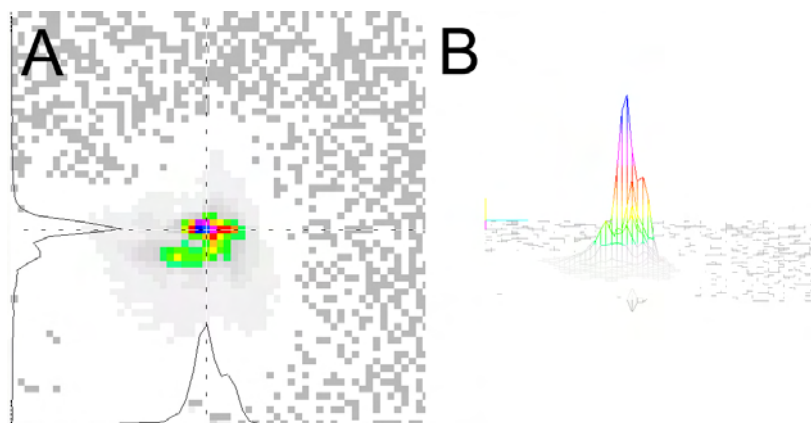


Abbildung 5.12: Optischer Laserfokusbereich (AP-SMALDI Ionenquelle, einstufige Voroptik)

Die Größe des Laserfokus der neuen AP-SMALDI Ionenquelle, installiert am LTQ-FT, wurde nach dem  $1/e^2$  Kriterium bestimmt (Abfall der maximalen Energiedichte im Zentrum des Laserfokus auf den  $e^2$ -ten Teil). (A) 2-D Ansicht, (B) 3-D Ansicht. Laserfokusgröße: x-Richtung  $\bar{x} = 6,6 \mu\text{m} \pm 0,7 \mu\text{m}$ ; y-Richtung  $\bar{y} = 5,8 \mu\text{m} \pm 0,8 \mu\text{m}$ ; Als Kreisdurchmesser ausgedrückt:  $6,2 \mu\text{m} \pm 0,6 \mu\text{m}$ ;  $n = 50$  Laserpulse (modifiziert nach Daten von Sabine Günther)

**5.3.2.1.2 Desorptions-Laserfokusbereich** Die Ausmaße des Desorptions-Laserfokusbereichs wurden nach zwei Kriterien bestimmt:

1. Nach optischer Erkennbarkeit der Brennflecken bei 1000-facher Mikroskopvergrößerung (= kleinstmöglicher Desorptions-Laserfokusbereich)
2. nach der Brennfleckengröße die mindestens nötig ist, um am LTQ MS noch Massenspektren mit ausreichendem Signal-Rausch-Verhältnis (Kriterium:  $NL = 1 \times 10^1$ ) zu ergeben (= kleinstmöglich messbarer Desorptions-Laserfokusbereich)

Bei beiden Kriterien wurden Messreihen einer homogenen Farbstoffoberfläche (siehe Kapitel 4.8.1, S.77), unter sukzessiver Abschwächung der Laserenergie, durchgeführt.

Der kleinstmögliche Desorptions-Laserfokusbereich weist eine Größe von  $\approx 0,5 \times 0,6 \mu\text{m}$  ( $\approx 0,3 \mu\text{m}^2$ ) auf (siehe Abb.5.14, S.131). Als Primäremission des Lasers wurden  $123 \mu\text{J}$  emittiert (Transmissionswerte: Neutralfilter 1 %, variabler Abschwächer  $\approx 2 \% \hat{=} 142,5$  steps; weitere optische Bauteile 17 %). Daraus ergibt sich eine Laserpulsenergie von  $4,5 \text{ nJ}$  ( $\hat{=} 2,5 \times 10^9 \text{ W/cm}^2$ ). Als Ionenquellenparameter waren eingestellt: Probentellerpotential  $+2,7 \text{ kV}$ , Blendenpotential  $+180 \text{ V}$ , Kapillartemperatur  $230^\circ\text{C}$ .

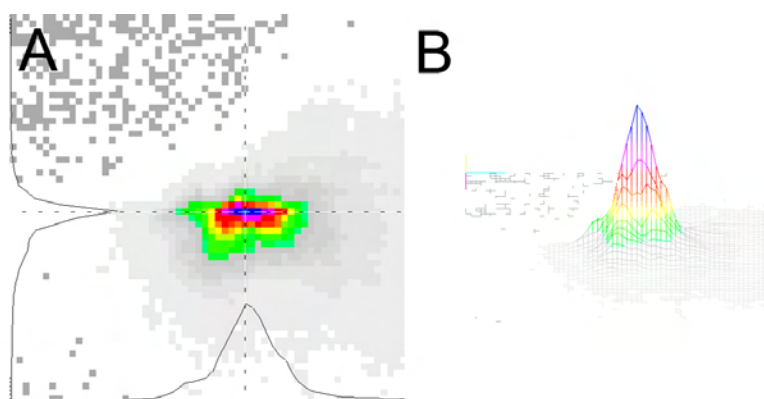


Abbildung 5.13: Optischer Laserfokusbereich (AP-SMALDI Ionenquelle, zweistufige Voroptik)

Die Größe des Laserfokus der neuen AP-SMALDI Ionenquelle, installiert am LTQ-FT, wurde nach dem  $1/e^2$  Kriterium bestimmt (Abfall der maximalen Energiedichte im Zentrum des Laserfokus auf den  $e^2$ -ten Teil). (A) 2-D Ansicht, (B) 3-D Ansicht. Größe des Laserstrahls im Fokus: x-Richtung  $\bar{x} = 15,1 \mu\text{m} \pm 1,4 \mu\text{m}$ ; y-Richtung  $\bar{y} = 8,1 \mu\text{m} \pm 1,1 \mu\text{m}$ ; Als Kreisdurchmesser ausgedrückt:  $11,6 \mu\text{m} \pm 1,1 \mu\text{m}$ ;  $n = 50$  Laserpulse (modifiziert nach Daten von Sabine Günther)

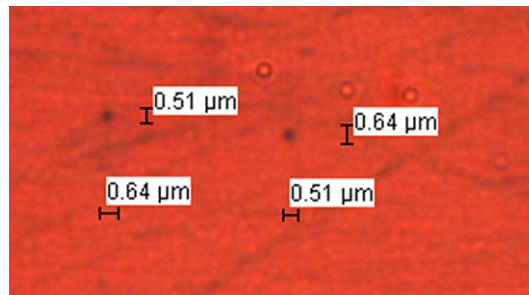


Abbildung 5.14: Kleinstmöglicher Desorptions-Laserfokusbrennfleckdurchmesser der AP-SMALDI Ionenquelle

Kleinstmögliche(r) Brennfleckengröße/Desorptions-Laserfokusbrennfleckdurchmesser ( $\approx 0,5 \times 0,6 \mu\text{m}$ ; 1000-fache Mikroskopvergrößerung, HF). Laserpulsenergie 4,5 nJ.

Der kleinstmöglich messbare Desorptions-Laserfokusbrennfleckdurchmesser ist  $\approx 0,9 \times 1 \mu\text{m}$  groß (siehe Abb. 5.15, S. 132). Dies entspricht einer Fläche von  $0,7 \mu\text{m}^2$  und ist damit etwa 2,7-mal so groß wie die Fläche des kleinstmöglichen Desorptions-Laserfokusbrennfleckdurchmessers. Die Primäremission des Lasers betrug hierbei  $136 \mu\text{J}$  und entspricht, bei gleicher Abschwächung wie oben, 4,8 nJ Laserpulsenergie (1,1-facher Energiebetrag im Vergleich zu oben). Die Laserenergiedichte beträgt  $9,9 \times 10^8 \text{ W/cm}^2$  und ist damit, trotz Steigerung der Laserpulsenergie, weniger als halb so hoch wie oben (näheres hierzu siehe Kapitel 3.3, S. 19). Im Folgenden wird deshalb die Angabe der Laserenergiedichte weggelassen und nur die Laserpulsenergie angegeben. Bei der Messung wurden folgende Ionenquellenparameter verwendet: Probenzellpotential +2,7 kV, Blendenpotential +215 V, Kapillartemperatur  $230^\circ\text{C}$ . Die Injektionszeit des LTQ MS betrug jeweils 350 ms.

**5.3.2.1.3 Ausreichender Desorptions-Laserfokusbrennfleckdurchmesser (LTQ MS)** Um bei LDI Untersuchungen an einer homogenen Farbstoffschicht stetig ausreichend intensive Spektren zu erhalten, muss die Größe der Brennflecken mindestens  $\approx 1,2 \times 3 \mu\text{m}$  betragen.

Dies entspricht einer Fläche von etwa  $2,8 \mu\text{m}^2$  und ist damit im Vergleich 11-mal so groß wie beim kleinstmöglichen Desorptions-Laserfokusbrennfleckdurchmesser. Bei einer Primärpulsenergie von  $124 \mu\text{J}$  beträgt die Laserpulsenergie im Probenbereich 161 nJ (Transmissionswerte: Farbfilter BG28 11,6 %, variabler Abschwächer  $\approx 1,1 \% \pm 160 \text{ steps}$ ). Die Signalintensität (NL) liegt bei etwa  $1,6 \times 10^1$ .

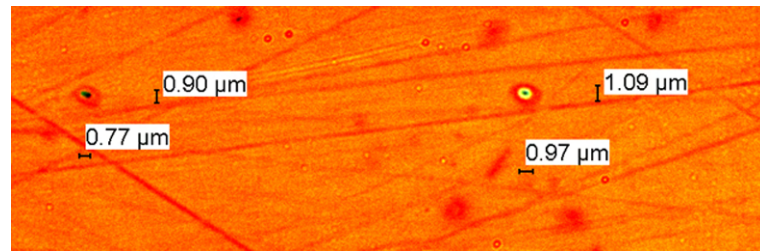


Abbildung 5.15: Kleinstmöglich messbarer Desorptions-Laserfokusbrennfleckdurchmesser der AP-SMALDI Ionenquelle (LTQ MS)

Kleinstmöglich messbare(r) Brennfleckengröße/Desorptions-Laserfokusbrennfleckdurchmesser bei Messungen mittels LTQ MS ( $0,9 \times 1 \mu\text{m}$ ; bei 1000-facher Mikroskopvergrößerung, HF). Laserpulsenergie  $4,8 \text{ nJ}$ .

#### 5.3.2.1.4 Ausreichender Desorptions-Laserfokusbrennfleckdurchmesser

(FT MS) Auch bei Messungen mittels FT MS ist permanent ein ausreichend hohes Farbstoffsignal in den MS Spektren zu beobachten. Hierzu muss die Größe der Brennflecken jedoch mindestens  $\approx 2,2 \times 5 \mu\text{m}$  aufweisen ( $\approx 6,9 \mu\text{m}^2$ ).

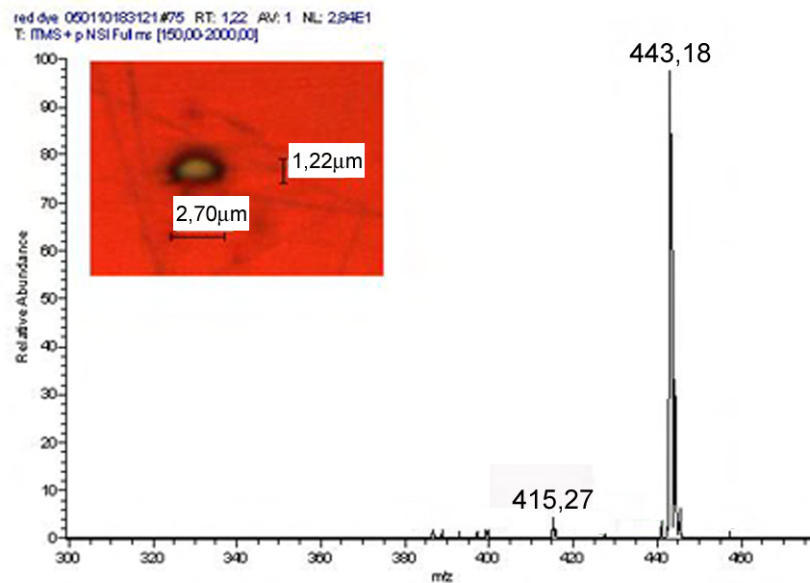


Abbildung 5.16: Ausreichender Desorptions-Laserfokusbrennfleckdurchmesser (LTQ MS)

Ausreichende(r) Brennfleckengröße/Desorptions-Laserfokusbrennfleckdurchmesser für Messungen mit permanent ausreichendem Signal-Rausch-Verhältnis der Massenspektren am LTQ MS und zugehöriges Massenspektrum. Die Brennflecken weisen eine Größe von etwa  $1,2 \times 3 \mu\text{m}$  auf (Lichtmikroskop, HF). Laserpulsenergie  $161 \text{ nJ}$ , Signalintensität (NL)  $\approx 1,6 \times 10^1$ .

Die Fläche ist damit 26-mal so groß wie die des kleinstmöglichen Desorptions-Laserfokusbereichs. Die Laserpulsenergie im Probenbereich beträgt dabei 633 nJ bei einer Primärpulsenergie von 124  $\mu\text{J}$  (Transmissionswerte: Farbfilter BG28 11,6 %, variabler Abschwächer  $\approx 4,2\% \hat{=} 127$  steps). Die Signalintensität (NL) liegt bei etwa  $1,5 \times 10^4$ .

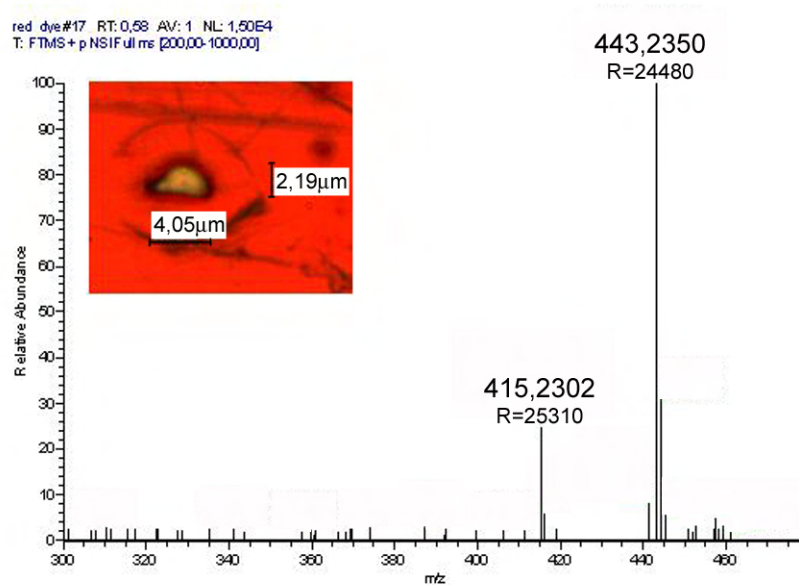


Abbildung 5.17: Ausreichender Desorptions-Laserfokusbereich (FT MS)

Ausreichende(r) Brennfleckengröße/Desorptions-Laserfokusbereich für Messungen mit permanent ausreichendem Signal-Rausch-Verhältnis der Massenspektren am FT MS und zugehöriges Massenspektrum. Die Brennflecken weisen eine Größe von etwa  $2,2 \times 4 \mu\text{m}$  auf (Lichtmikroskop, HF). Laserpulsenergie 633 nJ, Signalintensität (NL)  $\approx 1,5 \times 10^4$ . Massengenauigkeit 6 ppm (voreingestellte Auflösung 25000).

### 5.3.2.2 Brennfleckenvergleich: einstufige und zweistufige Voroptik

Wie in Kapitel 5.1.8 (S.118) und in Kapitel 5.2 (S.126) beschrieben, sollte der Teleskopaufbau zu einer Verbesserung der Sensitivität der AP-SMALDI Ionenquelle beitragen. Bei vergleichbaren Signalintensitäten wurden jedoch etwa doppelt so große Brennflecken erzeugt. Die Abbildung 5.18 (S.134) zeigt einen Vergleich von vier Brennflecken von denen je zwei mit der einstufigen und mit der Teleskopoptik erzeugt wurden. Beim Vergleich der beiden kleineren Brennflecken fällt auf, dass der Einschuss der Teleskopoptik (5.18 A) eine niedrigere Eindringtiefe als der Einschuss der einstufigen Optik (5.18 B) aufweist. Der



kleinere Einschuss der einstufigen Optik dringt bis auf den vergoldeten Probenträger ein. Zusätzlich ist beim kleinen Einschuss der einstufigen Voro­ptik ein deutlicherer Wulst erkennbar, der vermutlich durch das kurze Anschmelzen des Farbstoffes erzeugt wird. Dieser Wulst ist hier vergleichsweise erhabener als beim kleineren Einschuss der Teleskopoptik. Des Weiteren fallen zudem die Ränder der Einschüsse mit Teleskopoptik flacher ab.

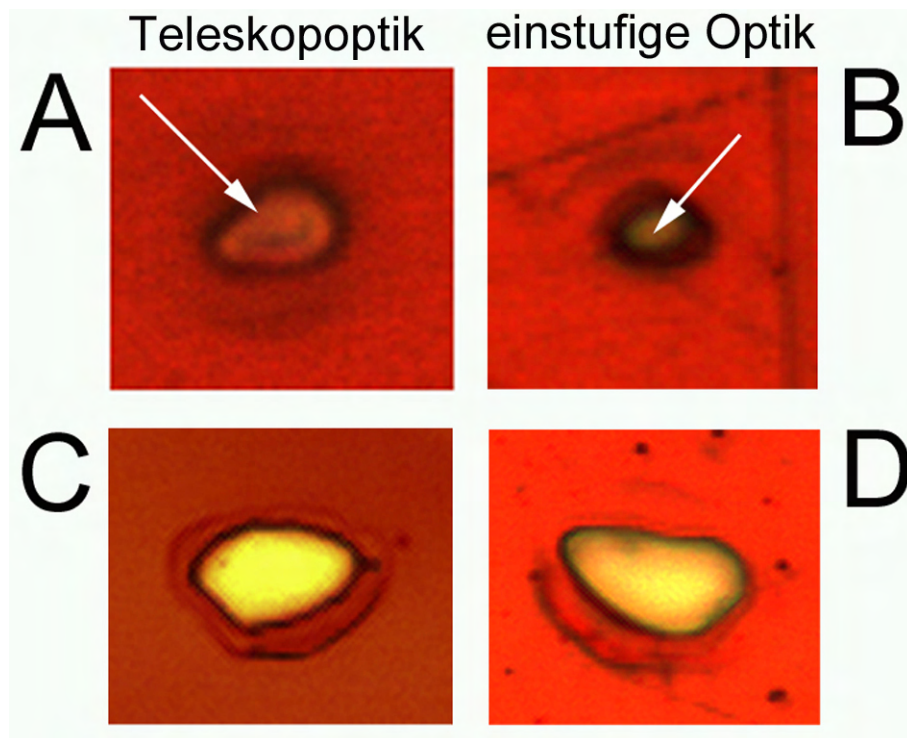


Abbildung 5.18: Brennfleckenvergleich (einstufige, zweistufige Voro­ptik) Je zwei größere und zwei kleinere Brennflecken sind vergleichend dargestellt. Zwei Brennflecken wurden mit der Teleskopoptik ((A) kleinerer Durchmesser, (C) größerer Durchmesser) und zwei mit der einstufigen Voro­ptik ((B) kleinerer Durchmesser, (D) größerer Durchmesser) erzeugt. (A) Die Desorption erfolgte nicht bis auf den Proben­träger und die Ränder des Einschusses sind sehr flach (weißer Pfeil). (B) Die Desorption erfolgte bis auf den vergoldeten Proben­träger und die Ränder des Einschusses sind steil (weißer Pfeil). Auch der Wulst um den Einschuss ist erhabener. (C und D) die Einschüsse sind vergleichbar, jedoch zeigt D einen etwas ausgeprägteren Randwulst.

Betrachtet man sich die großen Brennflecken der Teleskopoptik (5.18 C) und der einstufigen Voro­ptik (5.18 D), so sind die Unterschiede weniger deutlich. Lediglich der Wulst des Einschusses der einstufigen Voro­ptik ist auch hier im Vergleich etwas erhabener. Die für diesen Vergleich deponierten Laserpul­sen­ergien waren 2-4 mal höher für die Brennflecken der Teleskopoptik, als für



die der einstufigen Optik.

### 5.3.3 Scanning Laser Desorption/Ionisation – SLDI

Zur Charakterisierung der möglichen räumlichen Auflösung bei rasternden Messungen mit dem FT-ICR MS wurde ebenfalls eine homogene Farbstoffschicht (siehe Kapitel 4.8.1, S.77) untersucht. Die Farbstoffschicht wurde zusätzlich durch ein Metallgitter strukturell modifiziert. Die effektive laterale Auflösung wurde auf der Basis der Brennflecken auf  $\approx 7,6 \mu\text{m}$   $\varnothing$  bestimmt. Da die voreingestellte Schrittweite des x,y,z-Probenpositioniersystems  $7,44 \mu\text{m}$  betrug, überlappten die Messpunkte leicht. Die Abbildung 5.19 (S.135) ist das erste FT MS *image*, das mit der neuen AP-SMALDI Ionenquelle erzeugt wurde.

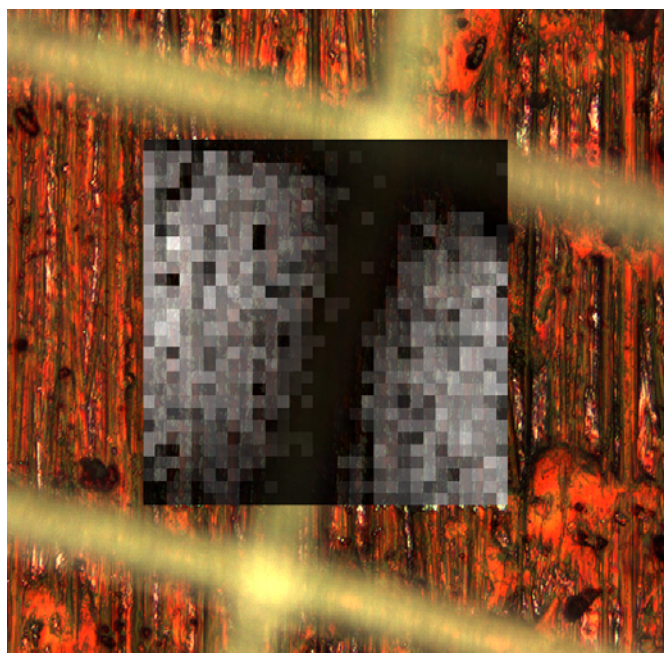


Abbildung 5.19: Rasternde Untersuchung (SLDI, FT MS) – Farbstofffilm mit Gitter

Ein Standard MALDI Probenträger wurde mittels Filzschreiber mit einer homogenen Farbstoffschicht (roter Edding) präpariert und zusätzlich mit einem Metallgitter (lichte Weite  $320 \mu\text{m}$ , Stegbreite  $40 \mu\text{m}$ ) versehen. Das *image* wurde aus FT MS Daten (Massenbereich: 50-500 Da, Auflösung: 50000, Massengenauigkeit: 10,3ppm) erzeugt. Pixelkantenlänge  $7,44 \mu\text{m}$ ,  $30 \times 30$  Pixel, effektive laterale Auflösung  $\approx 7,6 \mu\text{m}$   $\varnothing$  (Brennflecken), Laserpulsenergie  $\approx 2,8 \mu\text{J}$ .

### 5.3.4 Ergebniszusammenfassung – Optischer Laserfokusbereich, LDI und SLDI

Die Untersuchungen mittels *beam-profiler* ergaben einen optischen Laserfokusbereich ( $1/e^2$ -Kriterium) von  $6,2 \mu\text{m} \pm 0,6 \mu\text{m} \varnothing$  für die einstufige Voroptik. Zur Abschätzung des Desorptions-Laserfokusbereichs können die Brennflecken, die durch Laserbeschuss in Oberflächen (z.B. homogener Farbstofffilm) erzeugt werden, herangezogen werden. Die Brennflecken dienen somit der Ermittlung der effektiven lateralen Auflösung. Messreihen an Farbstofffilmen ergaben einen kleinstmöglichen, bei 1000-facher lichtmikroskopischer Vergrößerung noch erkennbaren Desorptions-Laserfokusbereich von  $\approx 0,6 \mu\text{m} \varnothing$ .

Über die Beobachtung des kleinstmöglichen Desorptions-Laserfokusbereichs hinaus wurden weitere Messungen an Farbstofffilmen vollzogen. Dabei wurden ergänzend MS Messungen durchgeführt. Somit konnte direkt, über die Betrachtung und Vermessung der erzeugten Brennflecken ein Zusammenhang zwischen lateraler Auflösung und analytischer Empfindlichkeit hergestellt werden. Folgende Spezifikationen wurden so für die neue AP-SMALDI Ionenquelle ermittelt:

- Brennfleckengröße  $\approx 1 \mu\text{m} \varnothing$  = erste Massenspektren der Hauptkomponente des Farbstoffes (Intensität (NL)  $\approx 1 \cdot 10^1$ ) am LTQ MS,
- Brennfleckengröße  $\approx 3 \mu\text{m} \varnothing$  = permanente Massenspektren der Hauptkomponente des Farbstoffes (Intensität (NL)  $\approx 2 \cdot 10^1$ ) am LTQ MS,
- Brennfleckengröße  $\approx 4 \mu\text{m} \varnothing$  = permanente Massenspektren der Hauptkomponente des Farbstoffes (Intensität (NL)  $\approx 1 \cdot 10^4$ ) am FT MS.

Bei der Spezifikation spielt die Laseroptik und damit die Form des Laserfokus (Energieverteilung im Fokusquerschnitt) eine wichtige Rolle. Erste rasternde Untersuchungen eines Farbstofffilms, der durch ein Gitter strukturell modifiziert wurde, ergaben, bei einer lateralen Auflösung von  $\approx 7,5 \mu\text{m} \varnothing$ , ein kontrastreiches *image* des Analytsignals.

## 5.4 Diskussion der Experimentellen Ergebnisse – Optischer Laserfokusbereich, LDI und SLDI

**Optischer Laserfokusbereich:** Der Vergleich der *beam-profiler* Aufnahmen unterschiedlicher laseroptischer Konfigurationen zeigt sehr deutlich Unterschiede in der Homogenität und Größe des Laserfokusquerschnitts. So beträgt der Durchmesser an dieser Stelle, bei einstufiger Voroptik,  $6,2 \mu\text{m} \pm 0,6 \mu\text{m}$

(Fläche  $\approx 30 \mu\text{m}^2$ ) im Vergleich zu  $11,6 \mu\text{m} \pm 1,1 \mu\text{m}$  Durchmesser (Fläche  $\approx 106 \mu\text{m}^2$ ) mit Teleskopoptik. Beim Vergleich der Querschnitte beider Laserfoki fällt auf, dass sich die Steilheit der Flanken, und damit die Geschwindigkeit der Energieabnahme zum Rand des Laserfokus hin, stark unterscheidet (siehe Abb.5.12, S.129 und Abb.5.13, S.130). Zusätzlich zeigt sich die Größe der einzelnen Farbflächen und Farbverläufe vergleichsweise größer und kontinuierlicher bei Verwendung der Teleskopoptik. Deren Querschnittsfläche im Laserfokus ist auch nahezu viermal so groß, im Vergleich zu einstufiger Voroptik. Die Verwendung der zweiten Vorlinse ( $L_2$ ) in der Teleskopoptik führt also nicht nur zu einer Änderung des Konvergenzwinkels am Objektiv, sondern auch zu einer Veränderung der Energieverteilung im Laserfokus. Zusätzliche Grenzflächen, die durch die zweite Linse eingebracht werden, könnten hierfür verantwortlich sein. Weitere Untersuchungen in dieser Hinsicht könnten sich deshalb der Untersuchung des Zwischenfokus zwischen  $L_1$  und  $L_2$  widmen.

**Korrelation des optischen mit dem Desorptions-Laserfokusbereich:** Die Korrelation des optischen mit dem Desorptions-Laserfokusbereich ist aus unterschiedlichen Gesichtspunkten nicht einfach. Wie bereits im Kapitel 4.3 (S.72) beschrieben, ergibt sich der optische Laserfokusbereich auf der Basis eines theoretischen Energiekriteriums (hier:  $1/e^2$  Kriterium). Die Ausmaße des Laserfokus hängen demnach von der maximalen Energiedichte im Zentrum und deren Abfall auf den  $1/e$ -ten Teil zum Rand hin ab. Bei MALDI Messungen wird die Größe des Desorptionsortes jedoch nicht durch einen theoretischen Schwellenwert, sondern durch den realen Desorptions-Schwellenwert des untersuchten Analyten bzw. der MALDI Matrix bestimmt. Material wird also in dem Probenbereich desorbiert, wo dieser spezifische Schwellenwert des Analyten energetisch durch den auftreffenden Laser noch überschritten wird. Dies hängt von zahlreichen Faktoren wie Absorptionskoeffizient und Kohäsivität des Analyten ab (Johnson und Sundvist, 1991; Zhigilei et al., 1997, 1998; Zhigilei und Garrison, 1998). Optischer und Desorptions-Laserfokusbereich unterscheiden sich also aufgrund ihres Bezugssystems (theoretische und praktische Schwellenenergie). Die Charakterisierung des Desorptions-Laserfokusbereichs über einen konkreten Energiebetrag stellt jedoch ein messtechnisches Problem dar. Der Sensor des *beam-profiler* Aufbau würde, bei Applikation der selben Laserenergiemenge wie sie für MALDI Untersuchungen verwendet wird, beschädigt werden. Durch Abschwächung kann die Laserenergie so weit reduziert werden, dass diese im *beam-profiler* Aufbau messbar wird. Dabei tritt jedoch erneut das Problem auf, dass sich Energiemenge und Fläche nicht-linear

zueinander ändern (siehe Abb.3.4, S.19). Die tatsächlichen Energieverhältnisse während der MALDI Messung könnten deshalb lediglich aus *beam-profiler* Daten interpoliert werden (siehe Kapitel 3.3, S.19). Durch die asymmetrische Laserenergieverteilung im gaußförmigen Laserstrahl kann also direkt, auf der Basis visualisierendes Techniken, wenig über die Energieverteilung bei einer echten MALDI Messung gesagt werden. Nichts desto trotz vermittelt die Visualisierung der Energieverteilung im Laserquerschnitt wichtige Informationen, um Messphänomene bei echten MALDI Messungen besser verstehen zu können. Im Gegensatz hierzu vermittelt die Beobachtung von Brennflecken auf der Probe unmittelbar, wie hoch lateral aufgelöst wurde oder werden kann, ohne dass eine Überlappung der Desorptionssorte (engl.: *oversampling*) auf der Probe erfolgt. Da davon ausgegangen wird, dass der Desorptions-Laserfokusbereich kleiner als der Ionisations-Laserfokusbereich ist, schließt die Beurteilung anhand von Brennflecken ein *oversampling* aus.

**LDI und SLDI:** Wie bereits erwähnt kann, durch die Korrelation zwischen Brennfleckengröße (z.B. in einer homogenen Farbstoffschicht) und Signalintensität im MS, die apparative Sensitivität bzw. der Justierungsstatus schnell und einfach ermittelt werden (siehe Kapitel 5.1.4, S.107 und Kapitel 5.3.2.1.3, S.131).

Der durch Abschwächung des Laserstrahls erreichbare kleinstmögliche Desorptions-Laserfokusbereich befindet sich, mit  $\approx 0,6 \mu\text{m}$  Ø, nahe dem Limit der lichtmikroskopischen Nachweisgrenze (1000-fache Vergrößerung; siehe Abb.5.14, S.131). Durch etwas geringere Abschwächung konnte ein stetiges Ionensignal, bei LDI Untersuchungen des Farbstoffes am LTQ MS, bei einer lateralen Auflösung von  $<3 \mu\text{m}$  Ø (siehe Abb.5.16, S.132) und am FT MS mit  $<4 \mu\text{m}$  Ø (siehe Abb.5.17, S.133) erzielt werden. Bei Betrachtung der minimalen Desorptions-Laserfokusbereich, die nötig sind, um bei den beiden Massenanalysatortypen (LTQ und FT-ICR) ein Signal zu erhalten, fällt ein doch erheblicher Unterschied auf. Das Flächenverhältnis, dass sich aus diesen Durchmessern ergibt, zeigt, dass eine 2,5-mal größere Fläche bei Messungen mit dem FT-ICR MS im Vergleich zum LTQ MS desorbiert werden muss, um stetig adäquate Massenspektren zu erhalten. Zu diesem Zeitpunkt war noch die FT-ICR und nicht die FT-ICR Ultra Zelle installiert.

Insgesamt ist das LTQ MS deutlich sensitiver, wie Abbildung 5.15 (S.132), anhand des kleinstmöglich messbaren Desorptions- Laserfokusbereichs, verdeutlicht. Dahingegen ist beim FT MS die Sensitivitätsgrenze beim ausreichenden Desorptions-Laserfokusbereich schon erreicht. Eine geringere Ionen-

menge ist nicht mehr messbar. In Bezug auf die Sensitivität ist das LTQ MS dem FT MS deutlich überlegen, was sich mit der Installation der FT-ICR Ultra Zelle noch verstärkte. Für Messungen, die mit der FT-ICR Zelle durchgeführt werden konnten, war die FT-ICR Ultra Zelle zu insensitiv.

Die erste rasternde FT MS Untersuchung mit der neuen AP-SMALDI Ionenquelle wurde an einer, durch ein Metallgitter strukturierten homogenen Farbstoffoberfläche, durchgeführt. Das Metallgitter besitzt eine Stegbreite von  $40\text{ }\mu\text{m}$  und eine lichte Weite von  $320\text{ }\mu\text{m}$ . Untersucht wurde ein  $30\times 30$  Pixel großes Areal (Pixelkantenlänge:  $7,44\text{ }\mu\text{m}$ ). Auf Basis der gewonnenen FT Daten konnte ein Verteilungsbild mit sehr gutem Kontrast erstellt werden. Allerdings wurde hier auch die Dauer solcher Untersuchungen mittels FT-ICR MS deutlich. Die 900 Pixel, die ein Probenareal von etwa  $225\times 225\text{ }\mu\text{m}^2$  umfassen, benötigen bei einer Aufnahmegeschwindigkeit von ca. 1 Hz 15 Minuten Messzeit.

Brennflecken, die mit einstufiger und zweistufiger Voroptyk erzeugt wurden, wurden lichtmikroskopisch genauer betrachtet. Die beobachteten Unterschiede werden in Kapitel 5.3.2.2 (S.133) näher beschrieben. Bei kleinem Laserfokussdurchmesser und einstufiger Voroptyk wurde die Farbstoffschicht, eines homogen beschichteten Probenträgers, vollständig desorbiert. Die Ränder des Desorptionskraters sind steil und der Desorptionssort ist von einem Wulst umgeben. Bei kleinem Laserfokussdurchmesser mit der Teleskopoptik weisen die Brennflecken eine abweichende Form auf. Die Kraterländer sind flacher und die Farbstoffdesorption erfolgte nicht bis zum Grund des Probenträgers.

Die vollständige Desorption des Farbstoffes bis zum Boden des Probenträgers bestätigt die stärkere Laserfokussierung bei einstufiger Voroptyk, mit schnell zu den Rändern des Fokusquerschnitts abnehmender Laserenergie. Der Wulst, der bei einstufiger Voroptyk am Rand zu beobachten ist, könnte durch photomechanischen Stress und kurzes Aufschmelzen des Farbstoffes verursacht worden sein (Sonntag et al., 2009; Zhigilei und Garrison, 2000). Das sowohl photomechanische als auch thermische Aspekte beteiligt sein könnten legt die intermediäre Pulsdauer des LTB MNL-202LD nahe. Der Wulst am Rande der Desorptionskrater ist auch bei den in Abbildung 5.18 (S.134) aufgeführten größeren Laserfoki, jedoch in schwächerer Form, zu beobachten. Eine Erklärung hierfür könnte in der schwächeren Wirkung photomechanisch oder thermisch aufgebauten Drucks bei der Formung großer Brennflecken liegen, da der größere Desorptionsraum eine stärkere Druckausdehnung nach innen ermöglicht.

Die bereits beschriebene homogenere Energieverteilung im Laserfokus bei

zweistufiger Voroptik wird zusätzlich dadurch gestützt, dass der große Brennfleck mit zweistufiger Voroptik, im Vergleich zum großen Brennfleck der einstufigen Voroptik, einen etwas schwächeren Wulst aufweist. Des Weiteren lässt sich daraus schließen, dass die während des Desorptionsprozesses mit der einstufigen Voroptik in der Probe aufgebauten Drücke, auch bei größeren Brennflecken, vergleichsweise größer sind oder stärker zum Tragen kommen. Weitere Überlegungen, inwiefern die homogenere Energieverteilung im Querschnitt des Laserfokus bei zweistufiger Voroptik zur Form der Brennflecken beiträgt, sollen im Folgenden dargestellt werden.

**Auswirkungen homogenerer Energieverteilung im Fokusquerschnitt der Teleskopoptik:** Erstaunlicherweise zeigt der Aufbau der Teleskopoptik eine niedrigere Sensitivität als der Aufbau mit einstufiger Voroptik, obwohl die Entfernung zwischen Laserfokus und der Öffnung der verlängerten Ionentransferkapillare um 2,3 mm verringert werden konnte. Die Beobachtungen, die im Kapitel 5.1.5 (S.108) dargestellt sind, legen nahe, dass sowohl das angelegte elektrische Potential des Probenhalters als auch der Sog, der in das MS strömenden Luft, die Haupttransportkräfte der Ionen in das MS sind. Deshalb wäre eigentlich zu erwarten gewesen, dass die konvektiven Kräfte, in Folge der Verringerung des Probenabstandes, stärker wirken und so die Ionen effektiver in das MS transportieren. Dies ist jedoch nicht der Fall. Eine Möglichkeit, die zum beobachteten Ergebnis geführt haben könnte, ist die Überbewertung der konvektiven Kräfte beim Ionentransport. Eine weitere Erklärung könnte in den Veränderungen des Laserfokus bei zweistufigen Voroptik, in Bezug auf die Energieverteilung im Querschnitt, liegen. Die Auswirkungen der homogeneren Energieverteilung im Laserfokus sollen durch Abbildung 5.20 (S.141) verdeutlicht werden.

Die flacheren Flanken führen zu einer Vergrößerung des Probenbereiches, in dem ausschließlich Desorption jedoch noch keine Ionisation stattfindet. Dieser Effekt würde durch eine Zunahme des Unterschieds zwischen Desorptions- und Ionisationsschwelle verstärkt werden. Die Laserpulsenergie muss bei homogenerer Energieverteilung im Laserfokus deutlich erhöht werden, um die gleiche Ionenausbeute zu erzielen. Wie Abbildung 5.20 (S.141) deutlich zeigt, deuten die bei kleinem Laserfokus der Teleskopoptik auftretenden flach abfallenden Wände des Desorptionskraters auf einen verbreiterten Bereich hin, in dem nur Desorption jedoch noch keine Ionisation stattfindet. Um mit der Teleskopoptik eine vergleichbare Ionenausbeute wie mit der einstufigen Voroptik zu erzielen, muss deshalb die laterale Auflösung gesenkt werden. Der Zusammenhang zwischen Eindringtiefe und Laserfokussierung wird u.a. bei Vaeck und Gijbels

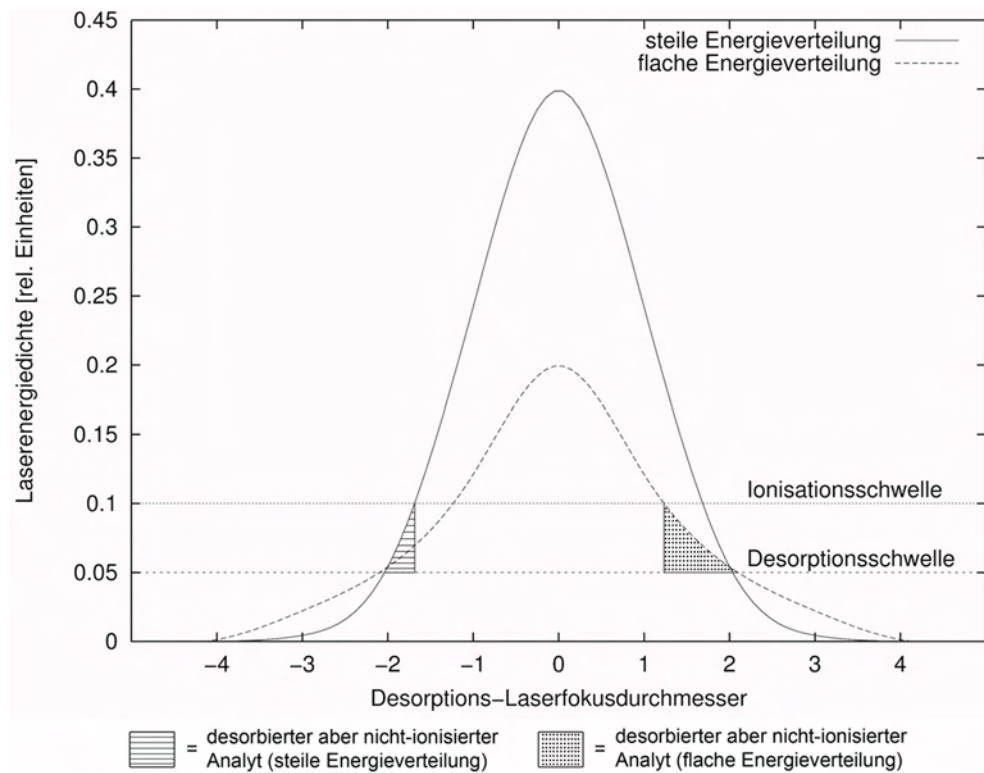


Abbildung 5.20: Energieverteilung im Laserfokus

Die Konsequenzen unterschiedlicher Energieverteilung im Laserquerschnitt bei einstufiger und zweistufiger Voroptik werden verglichen. Bei inhomogener Energieverteilung besitzt das Zentrum des Laserfokus eine hohe Energiedichte, die zum Rand hin schnell (steil) abfällt. Die Fläche zwischen Desorptions- und Ionisationsschwelle, in der ausschließlich Desorption des Analyten stattfindet, ist klein (gestreifte Fläche). Anders bei homogenerer Energieverteilung. Die Fläche zwischen Desorptions- und Ionisationsschwelle des Analyten, in der ausschließlich Desorption stattfindet, ist deutlich größer (gepunktete Fläche).

(1990a) erläutert. Eine etwaige Veränderung des Desorptionsvolumens wird bei der Vermessung der Brennflecken nicht explizit berücksichtigt.

Ergänzend sollte noch erwähnt werden, dass die flachere Energieverteilung im Laserfokusquerschnitt zu einer verringerten Desorption von Clustern geführt haben könnte. Sollte der Cluster-Ionisationsmechanismus der maßgeblich an der Ionenentstehung beteiligte Mechanismus sein, würde auch dies zu einer niedrigeren Signalintensität führen (Hankin und John, 1999; Karas und Krüger, 2003; Loboda und Chernushevich, 2005).

**Fazit:** Die neue AP-SMALDI Ionenquelle konnte sowohl über den optischen Laserfokusbereich als auch durch unterschiedliche Desorptions-Laserfokusbereich charakterisiert werden. Dabei wurde zur optischen Charakteri-

sierung das  $1/e^2$ -Kriterium benutzt. Die Charakterisierung bezüglich des Desorptions-Laserfokusbereichs gilt spezifisch für das chemisch-physikalische Verhalten des untersuchten Farbstoffes. Es konnte ein optischer Laserfokusbereich des installierten AP-SMALDI Aufbaus mit einstufiger Voroptik von  $6,2 \mu\text{m} \pm 0,6 \mu\text{m} \varnothing$  ( $A \approx 30 \mu\text{m}^2$ ) erzielt werden. LDI Untersuchungen ergaben, dass Spektren mit ausreichendem Signal-Rausch-Verhältnis mit einem Desorptions-Laserfokusbereich von  $\approx 3 \mu\text{m} \varnothing$  am LTQ MS und mit  $\approx 4 \mu\text{m} \varnothing$  am FT MS möglich sind. Erste SLDI Untersuchungen ergaben ein FT *image* mit sehr gutem Kontrast und einer lateralen Auflösung  $< 7,5 \mu\text{m}$ . Dabei wurde mit einer voreingestellten Massenauflösung von 50000 im Massenbereich  $m/z$  50-500 Da gemessen. Die Untersuchung des AP-SMALDI Aufbaus mit zweistufiger Voroptik (Teleskopoptik) resultierte nicht in einer gewünschten Erhöhung der Sensitivität. Es ergaben sich jedoch interessante Erkenntnisse in Bezug auf den Zusammenhang zwischen Sensitivität der AP-SMALDI Ionenquelle und der Energieverteilung im Querschnitt des Laserfokus.

## 5.5 Experimentelle Ergebnisse – Probengewinnung

### 5.5.1 Adaptierung der Zelllinien an serumfreie Medien (Zellkultur)

Wie in Kapitel 4.9.1 (S.80) bereits beschrieben, wurden u.a. humane, permanente Krebszelllinien als biologische Proben verwendet. Um Störungen durch unbekannte proteinische Komponenten bei der massenspektrometrischen Untersuchung weitestgehend auszuschließen, wurden die Zellen an serumfreie Medien zur Kultivierung adaptiert (siehe Kapitel 3.7.2, S.59). Die Ergebnisse dieser Adaptierung sind in Tabelle 4.5 (S.82) zusammengefasst. Zusätzlich werden Beobachtungen, in Bezug auf morphologische Charakteristika der adaptierten Zellen, durch die Abbildungen 5.21 (S.143) und 5.22 (S.143) verdeutlicht. Zusammenfassend können die Ergebnisse wie folgt umrissen werden:

- Die Zellen können in den genannten serumfreien Medien ohne Zeitverzögerung, also ohne eine lange Adaptierungsphase, kultiviert werden. Versuche mit sofortiger oder schrittweiser Senkung (2 %, 0,5 %) der FCS Konzentration zeigen dies.
- Die Kultivierung in serumfreiem Medium führt teilweise zu morphologischen Veränderungen (Form und Größe). Die Anzahl und Größe der Zellfortsätze bzw. der Zellverästelung (Lamellipodien, Filopodien) ändert sich.



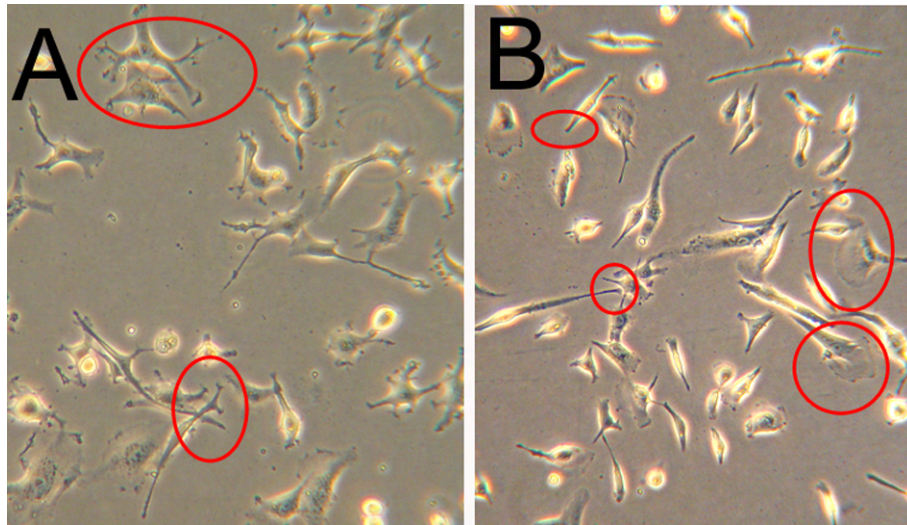


Abbildung 5.21: Zelllinie 8305C in konventioneller und serumfreier Kultur (A) Permanente, humane Krebszelllinie 8305C in konventionellem RPMI Medium. (B) 8305C Zellen in serumfreiem PC-1 Medium. Die roten Ellipsen verdeutlichen besondere morphologische Unterschiede unter beiden Kulturbedingungen. Unter konventionellen Bedingungen tritt eine verstärkte Verästelung der Zellfortsätze bei eher kompaktem Zellkörper (Soma) auf. Unter serumfreien Bedingungen ist ein eher spindelförmiger Zellkörper zu beobachten und die Verästelungen der Fortsätze nehmen ab oder es treten teilweise fein gezähnte, flächige Fortsätze auf.

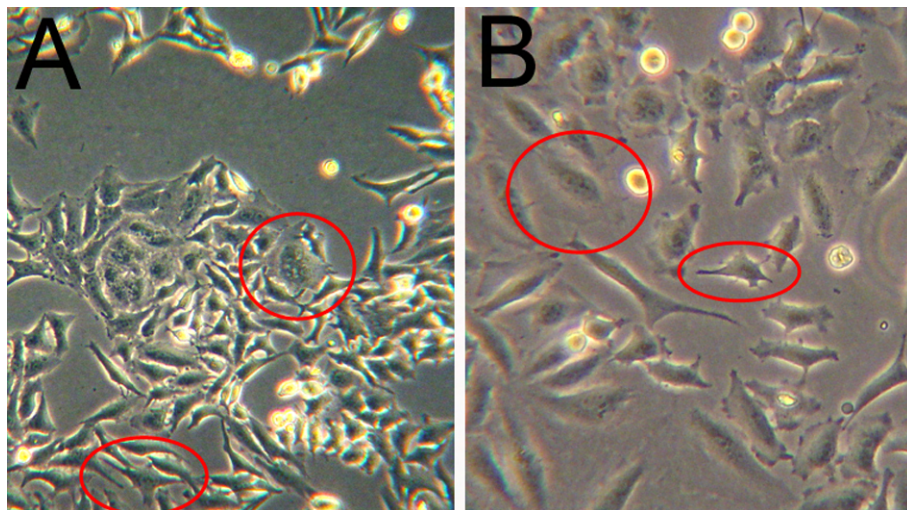


Abbildung 5.22: Zelllinie HeLa in konventioneller und serumfreier Kultur (A) Permanente, humane Krebszelllinie HeLa in konventionellem MEM Medium. (B) HeLa Zellen in serumfreiem Quantum 101 Medium. Die roten Ellipsen verdeutlichen besondere morphologische Charakteristika der HeLa Zellen. Sowohl die Verästelungen der Zellfortsätze als auch das teilweise vergrößerte Flächenwachstum treten in beiden Zellkulturmedien auf.

Die Gewinnung der Gewebeproben ist im Kapitel 4.9.2 (S.81) beschrieben.

## 5.6 Diskussion der Ergebnisse – Probengewinnung

Die Zellproben wurden vollständig im eigenen Zellkulturlabor kultiviert. Die Adaptierung der kultivierten Zellen an serumfreie Medien konnte, entgegen anders lautender Informationen, unproblematisch durchgeführt werden. Die wochenlange Adaptierung über mehrstufiges Absenken der FCS Konzentration musste nicht durchgeführt werden.

Im Verlauf der Arbeit stellte sich jedoch heraus, dass die kommerziell angebotenen serumfreien Medien recht große Unterschiede aufweisen. Dies bezieht sich vor allem auf die Menge und Qualität der proteinischen Zusätze, wie z.B. rekombinante Eiweiße oder Eiweißhydrolysate. Auch Informationen der Herstellerfirmen geben hier wenig Aufschluss. Die Firmen geben allenfalls qualitative Informationen über derartige Zusätze heraus. Die weitestgehende Eliminierung bzw. Minimierung medienbedingter massenspektrometrischer Hintergrundsignale wurde somit schwierig. Die Information, dass humane, rekombinante Eiweiße zugesetzt wurden, ermöglicht einen Ausschluss von Signalen im Massenspektrum. Dies gilt nicht für die Information, dass z.B. Sojaeiweiß-Hydrolysate enthalten sind (de la Barca et al., 2000; Khalil et al., 2006).

Versuche mit Eiweiß freiem Medium, an als robust geltenden HeLa Zellen, äußerten sich in Zellablösung vom Substrat, Ausbleiben des Wachstums, etc.. Dies zeigt die Wichtigkeit der proteinischen Zusätze. Die Verwendung eines komplett Eiweiß freien Mediums wäre deshalb nur unter kontrollierter Supplementierung möglich, die aber jahrelange Erfahrung im Bereich der Zellkultur erfordert.

Die beobachteten morphologischen Zellveränderungen (Größe und Form; siehe Abb.5.21, S.143 und Abb.5.22, S.143) lassen eine Veränderung auf molekularer Ebene vermuten. Dabei ist es jedoch schwierig eine Aussage darüber zu treffen, ob diese auf qualitativer Ebene, im Sinne der grundlegenden Änderung der Komposition der Zellmembran oder auf quantitativer Ebene stattfinden. Die morphologischen Veränderungen der Zellen (Lamellipodien, Filopodien) deuten auf eine Veränderung des Cytoskeletts und der daran beteiligten Strukturproteine hin (Nemethova et al., 2008). Die Untersuchung derartiger Fragestellungen waren nicht Gegenstand dieser Arbeit. Überprüfungen der Wachstumsgeschwindigkeit ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen konventionellen und serumfreien Bedingungen (Daten nicht gezeigt).

## 5.7 Experimentelle Ergebnisse – Zellpuffer, artifizielle Proben, Zell- und Gewebepvorbereitung, SMALDI-Präparation und -Untersuchung

Im Folgenden werden weitere Ergebnisse der experimentellen Arbeit vorgestellt. Die Intensitätsverteilung in den dargestellten massenspektrometrischen Verteilungsbildern wird in Graustufen (niedrigste Konzentration: schwarz, höchste Konzentration: weiß) oder Falschfarben (niedrigste Konzentration: Farbton nicht vorhanden, höchste Konzentration: Farbton am kräftigsten) wiedergegeben. Bei Angabe der Massenauflösung des FT-ICR Massenanalysators ist die voreinstellbare Massenauflösung des LTQ-FT gemeint (Massenauflösung bei  $m/z$  400 Da (FWHM); siehe Kapitel 3.4.1.1, S.22).

### 5.7.1 Zellpuffer – Entwicklung eines neuen Matrixgemisches

Bei der Herstellung der Zellpuffer (Zusammensetzung siehe Tab.5.4, S.149) wurde ein neuartiger wässriger Ansatz verfolgt. D(-)Mannitol, eine von Pflanzen als *compatible solute* (siehe Kapitel 3.8, S.59) natürlicherweise verwendete Substanz, wurde mit seinen besonderen Eigenschaften zur Präparation biologischer Proben verwendet. *compatible solutes* sind in der Lage zur Aufrechterhaltung zellphysiologischer Aktivitäten, unter Bedingungen des Mangels an freiem Wasser, beizutragen. In Mischungen soll D(-)Mannitol die Aktivität von Trypsin, unter Entzug von freiem Wasser, aufrecht erhalten und somit ein funktionierendes Enzymsystem sichern. Eine unter bestimmten Bedingungen gleichzeitig auftretende Erhöhung der Viskosität senkt dabei die Diffusionsgeschwindigkeit (Migration) entstehender Spaltprodukte. Der Bezug zwischen einer Erhöhung der Viskosität und der Senkung der Diffusion ergibt sich aus dem 2ten Fick'schen Diffusionsgesetz.

Die Einhaltung eines rein wässrigen Systems schließt dabei denaturierende und desintegrierende Prozesse an empfindlichen biologischen Systemen nahezu aus. Eine ideale Matrix, zur Präparation von *imaging* Proben, sollte folgende Eigenschaften aufweisen:

- Die Applikation der Matrix und die Matrix selbst müssen gewährleisten, dass Analyten ortsnahe verbleiben. Dies sind Voraussetzungen für eine authentische Probenpräparation. Herkömmlicherweise wird dies durch das *Airspray*-Verfahren erzielt. Jedoch wird hierbei auch ein relativ hoher organischer Lösungsmittelanteil verwendet, der die Gefahr der Desintegration biologischer Strukturen birgt.

- Bei der Applikation eines Matrixgemisches, in dem evtl. Trypsin schon enthalten ist, muss die Diffusion von Spaltprodukten z.B. durch intermediäre Erhöhung der Viskosität reduziert werden.
- Die abschließende Kristallisation der Matrix sollte möglichst feinkristallin erfolgen.

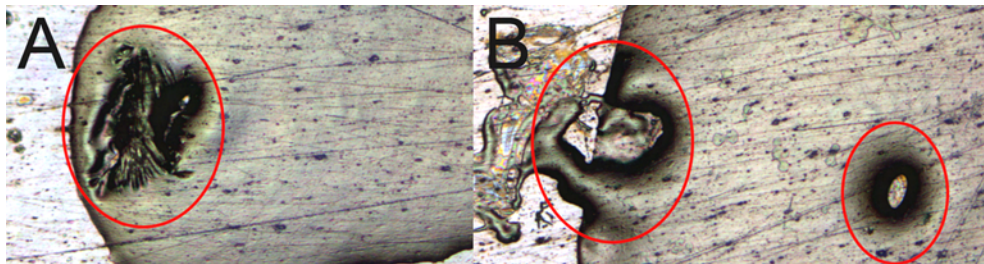


Abbildung 5.23: Viskosität des Zellpuffers

Mikroskopische Dokumentation (HF) von Zellpuffer 1 (ZP1). Die Abbildungen (A und B) zeigen eine gelartige Mischung von ZP1 und Trypsin ((A) 10:1, (B) 20:1) nach zweistündiger Inkubation im Inkubator (37°C, 100 % RH). Eine mechanische Verformung (rote Ellipsen) bleibt erhalten.

Durch die Entwicklung der Zellpuffer wurde versucht, diese Matriceigenschaften zu erzielen. Die Inhaltsstoffe führen zur Veränderung der Viskosität des Zellpuffers, nach Verlust eines bestimmten Anteils an freiem Wasser (siehe Abb.5.23, S.146). Die Mischung wird gelartig. Der Wasserverlust kann z.B. durch leichtes Eintrocknen mittels Fön erzielt werden.

Bei weiterem Verlust an Wasser aus dem Zellpuffer tritt schließlich meist Kristallisation bzw. Erstarren ein. Sollte die Kristallisation bzw. das Erstarren nicht eintreten, so kann diese, durch kurzes nachträgliches Besprühen mit Matrix mittels Airspray, ausgelöst werden (siehe Kapitel 4.10.2, S.83). Die Kristallisation erfolgt in Form einer homogenen Schicht aus feinen, nadelförmigen Kristallen. Der erstarrte Festkörper zeigt, erkennbar durch die Autofluoreszenz des 2,5-DHB, eine höchst homogene Kristallisation der Matrix (siehe Abb.5.24, S.147).

Die Abbildungen 5.24 (S.147) und 5.25 (S.147) zeigen, jeweils anhand einer Präparation von HeLa Zellen, den kristallisierten bzw. den erstarrten Zellpuffer. Beide Varianten können durch die Nutzung der Autofluoreszenz von 2,5-DHB kontrolliert werden. Biologische Strukturen sind dabei unterhalb der Matrixschicht gut erkennbar.



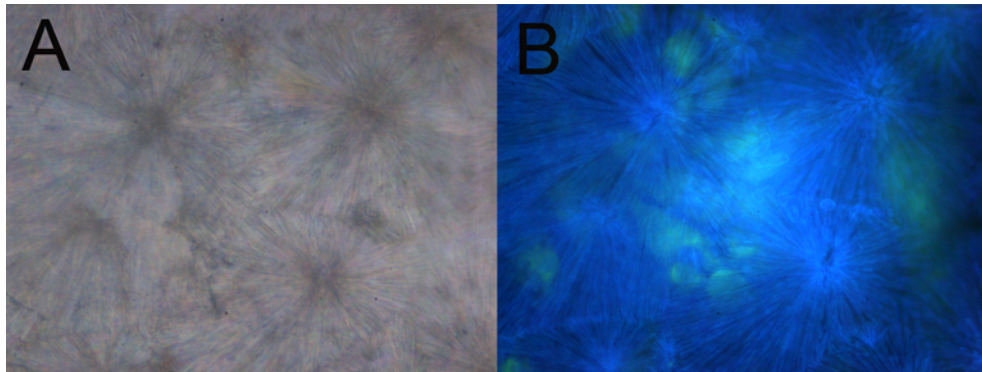


Abbildung 5.24: Kristallisierter Zellpuffer 1 über HeLa Zellen

Mikroskopische Dokumentation (HF, A und Autofluoreszenz, B, Filter 4) von Zellpuffer 1 (ZP1) nach Kristallisation über HeLa Zellen. Eine Trypsin Stammlösung wurde 1:20 mit ZP1 verdünnt. Die Zellen wurden 12 Stunden im Inkubator (37°C, 100 % RH) inkubiert. Anschließend erfolgte die Kristallisation. (A) Die Kristallschicht des Zellpuffers ist kontinuierlich. (B) Die Autofluoreszenzaufnahme zeigt deutlich die feinen, nadelförmigen 2,5-DHB Kristalle nach Trocknung des ZP1. Die HeLa Zellen (hellgrün) sind unter dem 2,5-DHB Kristallen (blau) erkennbar.

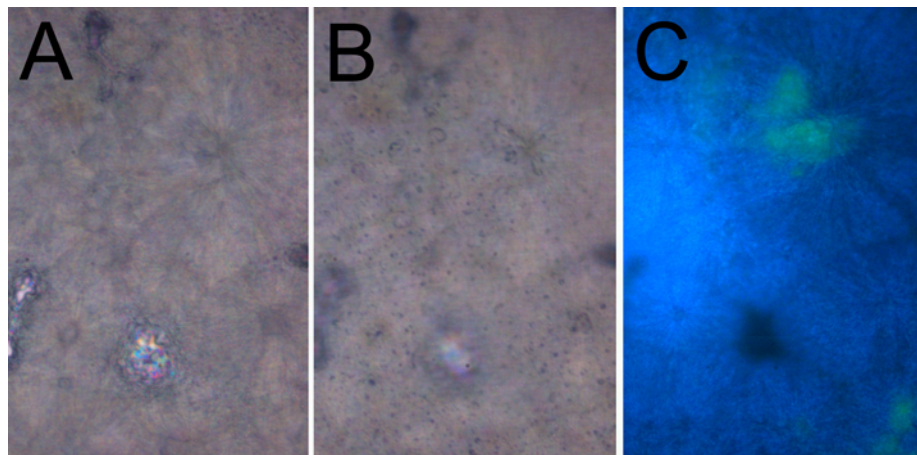


Abbildung 5.25: Erstarrter Zellpuffer 1 über HeLa Zellen

Mikroskopische Dokumentation (Hellfeld A, B und Autofluoreszenz C, Filter 4) von Zellpuffer 1 (ZP1) über HeLa Zellen nach Erstarrung. Eine Trypsin Stammlösung wurde 1:10 mit ZP1 verdünnt. Die Zellen wurden 12 Stunden im Inkubator (37°C, 100 % RH) inkubiert. Anschließend erfolgte die Erstarrung. (A, B) Die erstarrte Schicht des ZP1 ist kontinuierlich. Die Bilder A und B unterscheiden sich lediglich in der Fokusebene (A, Fokus tief; B, Fokus hoch). (C) Die Autofluoreszenzaufnahme macht die HeLa Zellen (hellgrün) deutlich unter dem erstarrten 2,5-DHB (blau) erkennbar.

#### 5.7.1.1 Zusammensetzung der Zellpuffer

Die Zusammensetzung der Zellpuffer-Gemische (siehe Tabelle 5.4, S.149) ist hypoton im Vergleich zum Cytoplasma (Osmolarität Cytoplasma: 0,3-0,4 mol/L). Die Zusammensetzung wurde nach Gefrierpunkt-osmometrischen Messungen klassischer Zellkulturmedien mit 10 % FCS (Osmolarität 0,439 Osmol/L; Osmomat 030, Gonotec GmbH) und der berechneten Osmolarität von DPBS Puffer ausgerichtet. Hypotone Milieus bewirken eine Aufnahme von freiem Wasser in die Zellen, u.U. auch eine Aufnahme der Komponenten der Zellpuffer.

Nach Lösen der Komponenten der Zellpuffer (D(-)Mannitol, 182,17 g/mol; Tris, 121,14 g/mol; 2,5-DHB, 154,12 g/mol) in  $H_2O$  wurde der pH-Wert der Puffer (pH 6) mittels HCl (Fluka) eingestellt und bis zum Zielvolumen aufgefüllt. Vor Verwendung der Zellpuffer werden diese zunächst mit  $H^+$ -Ionenaustauscher behandelt (frisch regenerierter Dowex 50 XW 8 Ionenaustauscher, Serva). Die Regeneration dieses stark sauren Ionenaustauschers erfolgte nach mündlicher Auskunft eines Mitarbeiters der Firma Serva. Die Regeneration hat folgendermaßen zu erfolgen:

1. Zweistündige Regeneration des Ionenaustauschers bei Raumtemperatur (RT) mit 2 mol/L HCl (Suprapur; Ionenaustauscher/Säure-Volumenverhältnis 1:5).
2. Anschließend mit dest.  $H_2O$  bis zur Neutralität des Waschwassers waschen (Ionenaustauscher/ $H_2O$ -Volumenverhältnis 1:6).

Zur Entsalzung des Zellpuffers werden 100  $\mu$ L sedimentierte Ionenaustauscher-Körnchen in ein Eppendorf Hütchen vorgelegt, um 1 mL Zellpuffer unter Schütteln (1 Minute) zu entsalzen. Nach erneutem Sedimentieren des Ionenaustauschers wird der Überstand in ein frisches Eppendorf Hütchen umpipettiert. Der Zellpuffer sollte nicht über den Ionenaustauscher-Kügelchen gelagert werden, da sich Bestandteile des Harzes herauslösen und die massenspektrometrische Analyse beeinträchtigen können. Der entsalzte Zellpuffer kann bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert werden. Gemische mit Trypsin sollten frisch bereitete werden. Gemische mit Peptiden können bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert werden.

#### 5.7.1.2 Applikation der Zellpuffer

Die verschiedenen Zellpuffer wurden auf zweierlei Weise appliziert, zum einen mittels einer normalen Kolbenhubpipette (Eppendorf), zum anderen mit Hilfe eines Mikromanipulators. Beim Mikromanipulator handelt es sich um eine im

Tabelle 5.4: FORMULIERUNGEN DER ZELLPUFFER (ZP) 1, 2 UND 2A

In den Zellpuffern 1, 2 und 2a enthaltene Komponenten und deren Konzentrationen (2,5-DHB, 154,12 g/mol; D(-)Mannitol, 182,17 g/mol; Tris-Base, 121,14 g/mol).

Komponente	Konzentration [mol/L]	Menge [g/10mL]
<b>ZP 1</b>		
D(-)Mannitol	0,056	0,1020
Tris Base	0,040	0,0485
2,5-DHB	0,025	0,0385
<b>Gesamt</b>	<b>0,121</b>	0,1890
<b>ZP 2</b>		
D(-)Mannitol	0,056	0,1020
Tris Base	0,030	0,0363
2,5-DHB	0,030	0,0462
<b>Gesamt</b>	<b>0,116</b>	0,1845
<b>ZP 2a</b>		
D(-)Mannitol	0,056	0,1020
Tris Base	0,042	0,0509
2,5-DHB	0,060	0,0925
<b>Gesamt</b>	<b>0,158</b>	0,2454

Haus gebaute Vorrichtung, mit der eine *fused silica* Kapillare mittels Mikrometerschrauben sehr genau positioniert werden kann. Die über die Kapillare zu applizierende Lösung wird mit einer Mikroliterspritze dosiert. Der Mikro-manipulator ermöglicht so die exakte Mikropräparation einzelner Zellen oder Strukturen. Die Auftragung erfolgte entweder als:

- Zellpuffer
- Zellpuffergemisch (Zellpuffer + Peptide)
- Zellpuffergemisch (Zellpuffer + Trypsin)
- Zellpuffergemisch (Zellpuffer + Peptid + Trypsin)

Nach der Auftragung einer bestimmten Menge Zellpuffer, auf eine artifizielle oder biologische Probe, wurde dieser leicht antrocknen lassen bzw. komplett getrocknet. Die Aktivität des verwendeten Trypsins wurde unter Standardbedingungen und adäquater Konzentration überprüft (Roche Diagnostics GmbH, 2009). Zur tryptischen Inkubation einer biologischen Probe mit Zellpuffer wurde wie folgt verfahren:

1. Eine frisch angesetzte Mischung aus Trypsin Stammlösung (Trypsin in

0,1 N HCl) 1:10 oder 1:20 mit Zellpuffer verdünnt wird auf eine Probe aufgetragen.

2. Die aufgetragene Mischung wird leicht eingetrocknet, bis sich der konvexe Meniskus des aufgetragenen Tropfens (Zellpuffergemisch) merklich gesenkt hat, aber noch keine Erstarrung oder Kristallisation eingetreten ist.
3. Die so vorbereitete Probe wird nun im Inkubator in einer Kunststoffpetrischale, die etwas dest.  $H_2O$  enthält, für die gewünschte Zeit inkubiert.

### 5.7.1.3 Massenspektrum des Zellpuffers

Die massenspektrometrischen Hintergrundsignale der Zellpuffer sollen anhand des Massenspektrums von Zellpuffer 1 demonstriert werden. Die unterschiedlichen Zellpufferformulierungen unterscheiden sich lediglich in ihren Mengenverhältnissen, nicht aber in ihrer grundsätzlichen Komposition (siehe Abb.5.26, S.150). Die aufgetretenen Massensignale werden in Tabelle 5.5 (S.151) näher erläutert.

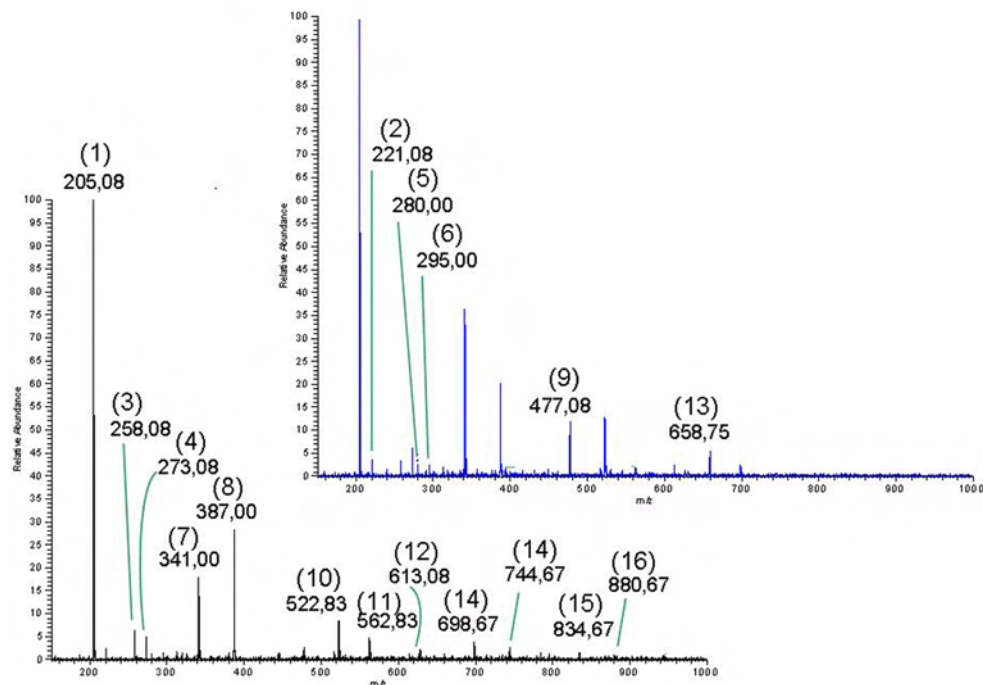


Abbildung 5.26: Massenspektren von reinem Zellpuffer 1

(Schwarz) Spektrum mit 27 nJ Laserpulsenergie erzeugt. (Blau) Spektrum mit 37 nJ Pulsenergie erzeugt. Im blauen Spektrum werden nur die zusätzlich zum schwarzen Spektrum aufgetretenen Signale aufgeführt.



Die Spektren zeigen Quasimolekülonen unterschiedlicher Zusammensetzung im Massenbereich bis etwa  $m/z$  500 Da, die protoniert oder mit Natrium assoziiert sind. Alkaliaddukte werden dabei hauptsächlich von Quasimolekülonen gebildet, die D(-)Mannitol enthalten. Dies ist typisch für Saccharide bzw. Saccharidderivate. Zudem neigt D(-)Mannitol, im Gegensatz zu TRIS, stärker zur Adduktbildung mit 2,5-DHB. Insgesamt sind die Signale der Mannitoladdukte stärker als die weiteren Adduktionen. TRIS bildet bis etwa  $m/z$  400 Da Addukte mit 2,5-DHB. Bei den größeren Adduktionen (ab  $\approx m/z$  660 Da) scheint es sich vornehmlich um Quasimolekülonen mit  $H^+$  als Ladungsträger zu handeln. Massensignale reiner 2,5-DHB Cluster treten bis etwa  $m/z$  850 Da auf.

Tabelle 5.5: MÖGLICHE MÖGLICHE IONENZUSAMMENSETZUNG (ZELLPUFFER 1 MASSENSPEKTREN)

Mögliche Zusammensetzung der Ionen als Grundlage der Massensignale in Zellpuffer 1 Spektren (aufgenommen mit zwei unterschiedlichen Laserpulsstärken: 27 und 37 nJ).

Signal Nr.	$m/z$ [Da]	Zusammensetzung
1	205,08	$[\text{Mannitol} + \text{Na}]^+$
2	221,08	$[\text{Mannitol} + \text{K}]^+$
3	258,08	$[\text{DHB} + \text{TRIS} - \text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$
4	273,08	$[2\text{DHB} - 2\text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$
5	280,00	$[\text{DHB} + \text{TRIS} - \text{H}_2\text{O} + \text{Na}]^+$
6	295,00	$[2\text{DHB} - 2\text{H}_2\text{O} + \text{Na}]^+$
7	341,00	$[\text{Mannitol} + \text{DHB} - \text{H}_2\text{O} + \text{Na}]^+$
8	387,00	$[2\text{Mannitol} + \text{Na}]^+$
9	477,08	$[\text{Mannitol} + 2\text{DHB} - 2\text{H}_2\text{O} + \text{Na}]^+$
10	522,83	$[2\text{Mannitol} + \text{DHB} - \text{H}_2\text{O} + \text{Na}]^+$
11	562,83	$[4\text{DHB} - 3\text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$
12	613,08	$[\text{Mannitol} + 3\text{DHB} - 3\text{H}_2\text{O} + \text{Na}]^+$
13	658,75	$[2\text{Mannitol} + 2\text{DHB} - 2\text{H}_2\text{O} + \text{Na}]^+$
14	744,67	$[\text{Mannitol} + 4\text{DHB} - 3\text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$
15	834,67	$[6\text{DHB} - 5\text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$
16	880,67	$[\text{Mannitol} + 5\text{DHB} - 4\text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$

#### 5.7.1.4 Signalqualität der MS Spektren peptidischer Zellpuffer Präparationen

Zur Bestimmung der Spektrenqualität von Peptiden in Zellpuffer wurden Präparationen von Zellpuffer 2 und mehreren Peptiden (Penta-Glycin, Angiotensin II, Substanz P) erstellt. Das Matrix:Peptid Verhältnis betrug 500:1, das Additiv:Peptid Verhältnis 2000:1 (Spektrum siehe Abb.5.27, S.152). Mit Additiv ist die molare Summe aller Komponenten des Zellpuffer gemeint.

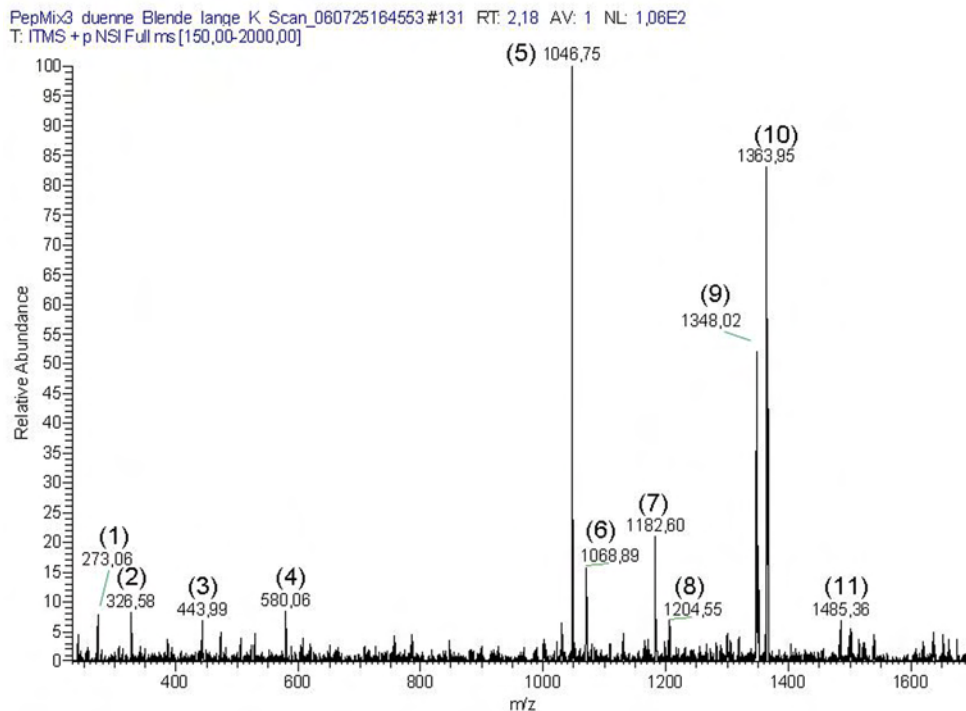


Abbildung 5.27: Massenspektrum einer Peptidmischung in Zellpuffer 2

Massenspektrum einer Peptidmischung in Zellpuffer 2 (Peptide: Penta-Glycin, Angiotensin II und Substanz P; Gesamtkonzentration  $\approx 6 \cdot 10^{-5}$  mol/L). Als Massensignale konnten beobachtet werden: (1)  $[2\text{DHB}-2\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ , (2)  $[\text{Mannitol}+\text{TRIS}+\text{Na}]^+$ , (3)  $[3\text{DHB}-\text{H}_2\text{O}]^+$ , (4)  $[4\text{DHB}-2\text{H}_2\text{O}]^+$ , (5)  $[\text{Angiotensin II}+\text{H}]^+$ , (6)  $[\text{Angiotensin II}+\text{Na}]^+$ , (7)  $[\text{Angiotensin II}+\text{DHB}+\text{H}]^+$ , (8)  $[\text{Angiotensin II}+\text{DHB}+\text{Na}]^+$ , (9)  $[\text{Substanz P}+\text{H}]^+$ , (10)  $[\text{Substanz P}+\text{O}+\text{H}]^+$ , (11)  $[\text{Substanz P}+\text{DHB}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ .

Mischungen mit einem erhöhten Matrixanteil (Analyt:Matrix Verhältnis bis zu 1:6000) führen ebenfalls zu Massenspektren mit einem guten Signal-Rausch-Verhältnis. Dies entspricht einem Additiv:Peptid Verhältnis von 23200:1 ( $\approx 5 \cdot 10^{-6}$  mol/L Peptidgesamtkonzentration).

#### 5.7.1.5 Vergleich der Signalqualität und -intensität zwischen Zellpuffer und Standard MALDI Präparation

Zum Vergleich der Signalintensität und -qualität, zwischen Zellpuffer und Standard MALDI Präparationen, wurden vergleichbare *dried droplet* Präparation hergestellt und untersucht. Beide Proben wiesen eine identische Peptidkonzentration auf (je  $2 \cdot 10^{-6}$  mol/L Bradykinin 1-7 und Angiotensin II). Zum Vergleich wurden Summenspektren beider Untersuchungen über alle während der Untersuchung erzeugten Spektren gebildet (siehe Abb.5.28, S.154;  $n = 625$ ). Eini-

ge der aus den Summenspektren ermittelten Daten sind zusätzlich in Tabelle 5.6 (S.153) aufgeführt. Das Summenspektrum der Standard 2,5-DHB MALDI Präparation (Abb.5.28, oben) zeigt im Vergleich zum Summenspektrum der Zellpuffer 2 Präparation (Abb.5.28, unten) höhere Hintergrundsignale. Weitere Ergebnisse werden anhand der extrahierten Daten in Tabelle 5.6 vorgestellt.

Vergleicht man die absolute Signalstärke des MS Detektors der Messungen der peptidischen Standard MALDI und Zellpuffer 2 Präparation (siehe Tabelle 5.6, S.153), so erkennt man einen Zuwachs von insgesamt  $\approx 30\%$  Signalstärke (Bradykinin 1-7 und Angiotensin II Signal) bei der Zellpuffer 2 Präparation im Vergleich zur Standard MALDI Präparation. Zusätzlich ergibt sich eine Minderung der pro Spektrum verbrauchten Analytmenge bei der Zellpuffer 2 Präparation um  $-20\%$  ( $8 \cdot 10^{-17}$  mol Zellpuffer 2 Präparation,  $10 \cdot 10^{-17}$  mol Standard MALDI Präparation). Das Matrix:Analyt Verhältnis beträgt dabei 10833:1 für die Standard MALDI Präparation und 7500:1 (Additiv:Analyt Verhältnis 29000:1) bei der Zellpuffer Präparation.

Ein wichtiger Gesichtspunkt der Messungen ist, dass die dargestellten Signalintensitäten bei der Standard MALDI 2,5-DHB Präparation im signalstarken Randbereich erzielt wurden, während bei der Zellpufferpräparation gleich starke Signale im gesamten Präparationsbereich erzielt werden konnten. Dies ist im Zellpuffer gewährleistet obwohl ebenfalls 2,5-DHB als Matrix verwendet wird.

Tabelle 5.6: VERGLEICH SIGNALINTENSITÄT, MATRIX/ANALYT-VERHÄLTNIS UND DESORPTIONSFLÄCHE: STANDARD MALDI UND ZELLPUFFER 2 PRÄPARATION

Vergleichende Darstellung der Signalintensität, Desorptionsfläche und des Matrix/Analyt-Verhältnisses einer Standard MALDI und einer Zellpuffer 2 Peptidpräparation (Bradykinin 1-7 und Angiotensin II, je  $2 \cdot 10^{-6}$  mol/L.

Vergleichsgröße	Standard MALDI Präparation	Zellpuffer 2 Präparation
Signalintensität Bradykinin 1-7 $[M+H]^+$	5,24	5,18 (-1,1 %)
Signalintensität Angiotensin II $[M+H]^+$	8,18	11,07 (+35 %)
Analytmenge $[*10^{-18} \text{ mol}]$	100	80 (-20 %)
Matrix/Analyt- Verhältnis	16233	7500
Additiv/Analyt- Verhältnis	16233	29000

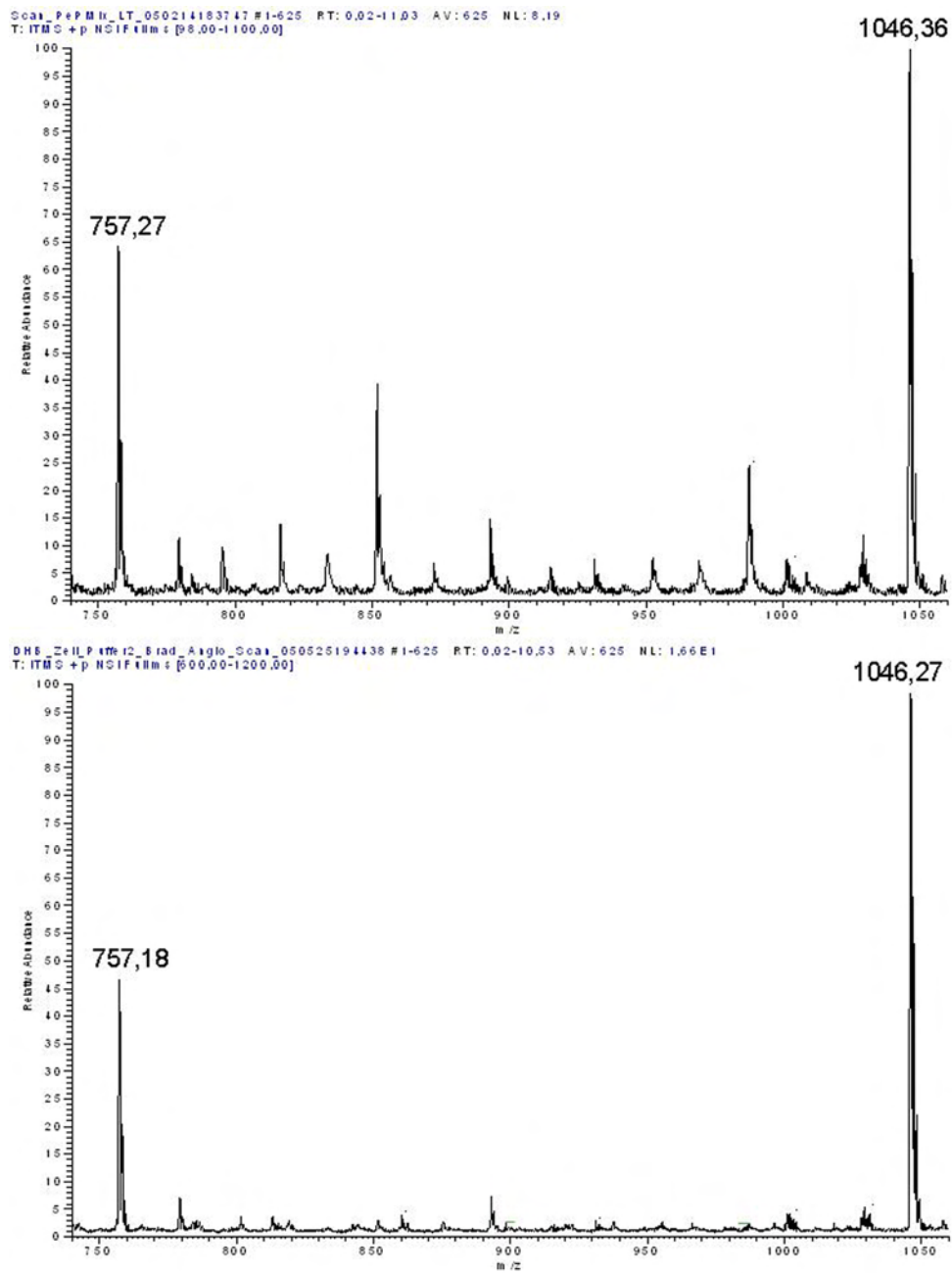


Abbildung 5.28: Massenspektren einer peptidischen Standard MALDI Präparation und in Zellpuffer 2

(Oben) Standard MALDI Präparation (Summenspektrum). (Unten) Zellpuffer 2 Präparation (Summenspektrum). Präpariert wurden jeweils Bradykinin 1-7 ( $[M+H]^+$ ;  $m/z$  757,3 Da;  $2 \cdot 10^{-6}$  mol/L) und Angiotensin II ( $[M+H]^+$ ;  $m/z$  1046,4 Da;  $2 \cdot 10^{-6}$  mol/L).  $n = 625$  Einzelschusspektren. Die y-Achse zeigt die Intensität als absolutes Detektorsignal.

### 5.7.2 Ergebniszusammenfassung – Zellpuffer

Die Kombination herkömmlicher, in der Biologie und Massenspektrometrie eingesetzter Substanzen (D(-)Mannitol; Tris; 2,5-DHB), ergab ein Gemisch mit interessanten Eigenschaften (Zellpuffer). Der Zusatz von D(-)Mannitol und Tris veränderte die Eigenschaften einer eintrocknenden, wässrigen 2,5-DHB Matrixlösung auf zweierlei Art: 1) die Lösung wird intermediär höher viskos (gelähnlich) und 2) das Kristallisationsverhalten der Matrix wird derart geändert, dass die Kristallisation in Form einer Schicht aus feinen, nadelförmigen Kristallen erfolgt oder die Mischung amorph erstarrt. Die Effizienz der Matrix wird dabei erhöht, wie ein Vergleich von Summenspektren einer Standard MALDI mit einer Zellpuffer 2 Präparation zeigt. Die Signalintensität der Zellpuffer 2 Präparation steigt im Vergleich um  $\approx 30\%$  an, während die Menge des verbrauchten Analyten um  $20\%$  abnimmt. Hinzu kommt, dass Signale derart hoher Intensität im gesamten Bereich einer Zellpufferpräparation erzielt werden können. Im Gegensatz hierzu sind in aller Regel gute Signale bei *dried droplet* Standard MALDI 2,5-DHB Präparationen nur im Randbereich (*sweet spots*) zu erzielen. In Bezug auf das Matrix:Analyt (Additiv:Analyt) Verhältnis, bei dem gute Massenspektren erzielt werden können, besteht ein großer Konzentrationspielraum. Die Massenspektren von Zellpuffer Präparationen enthalten im unteren Massenbereich zusätzliche Signale von D(-)Mannitol und Tris-Addukten.

### 5.7.3 Massenspektrometrische Untersuchung strukturierter artifizieller Oberflächen

Strukturierte artifizielle Oberflächen wurden auf zwei Arten hergestellt: 1) durch nachträgliche Strukturierung von Standard MALDI Probenträgern (z.B. durch metallische Gitter) oder 2) durch Präparation vorstrukturierter Oberflächen (z.B. geätzte Silizium Wafer) (siehe Kapitel 4.8.2, S.77).

#### 5.7.3.1 LTQ MS Untersuchungen

##### MS<sup>1</sup>:

Unter Verwendung des LTQ MS wurde eine *dried droplet* Präparation aus zwei Peptiden in Zellpuffer 2 untersucht. Über die Präparation wurde ein TEM Gitter platziert. Auf dem TEM Gitter selbst wurde keinerlei Analytsubstanz aufgetragen. Die lichtmikroskopische Betrachtung der Desorptionssorte auf der Probe zeigte eine effektive laterale Auflösung von  $\approx 7,5\ \mu\text{m}$  Ø. Berechnungen der dabei desorbierten Peptidmenge ergaben eine Menge von  $39 \cdot 10^{-18}$  mol/Pixel. Aus den massenspektrometrischen Daten konnten zwei Verteilungsbilder erstellt werden,

die die Lage des Gitters als strukturelles Element kontrastreich wiedergeben (siehe Abb.5.29, S.156).

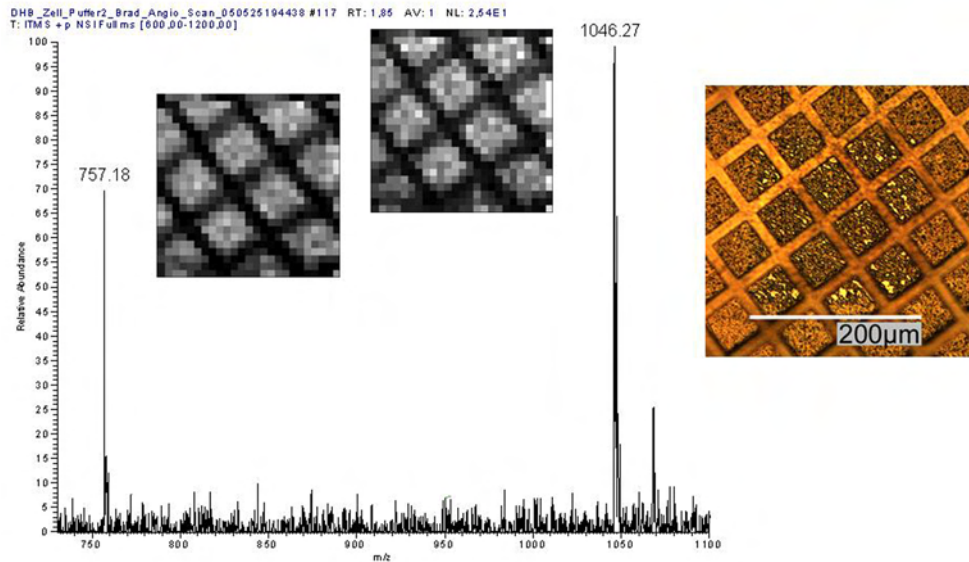


Abbildung 5.29: Strukturierte Zellpuffer-Peptidpräparation (*dried droplet*), SMALDI *image* (Einzelschusspektren, MS<sup>1</sup>, LTQ MS)

Massenspektrum von Bradykinin 1-7 ( $[M+H]^+$ , m/z 757,18 Da) und Angiotensin II ( $[M+H]^+$ , m/z 1046,27 Da), aufgenommen während einer rasternden Untersuchung mit der LTQ als Massenanalysator. Die Präparation wurde durch ein TEM Gitter modifiziert (lichte Weite 42 µm, Stegbreite 12 µm). Das lichtmikroskopische Bild zeigt den abgerasterten Probenbereich, der durch die Verteilungsbilder der beiden Peptide wiedergegeben wird. 25×25 Pixel; 8,06 µm Pixelkantenlänge; effektive laterale Auflösung  $\approx 7,5$  µm Ø.

Das Potential des Zellpuffers, im Hinblick auf die Präparation feinsten Oberflächenreliefs, konnte bei der Präparation des Sägezahn-targets demonstriert werden. Die Präparation zeigt eine sehr homogene, geschlossene Schicht aus Matrixkristallen innerhalb der gegebenen Mikrovertiefungen (siehe Abb.5.30 B, S.157). Deutlich sind die Zähnungen nach der Präparation erkennbar, obwohl es sich um feinste Mikrostrukturen handelt (Breite vor der Spitze:  $\approx 30$  µm). Präparationsversuche mit alkoholischen Standard 2,5-DHB Matrixlösungen führten zu keinem Ergebnis. Die entstehenden großen 2,5-DHB Kristalle maskieren die Struktur des geätzten Silizium Wafers. Die Verwendung von  $\alpha$ -Cyano als Matrix führte zwar zu kleinen Kristallen, es bildete sich jedoch keine kontinuierliche Kristallschicht aus (Daten nicht gezeigt).

Das Sägezahn-target wurde erneut durch eine Mischung aus Zellpuffer 2 und dem synthetischen Peptid SLLPAIVEL (*single letter code*) präpariert und unter-

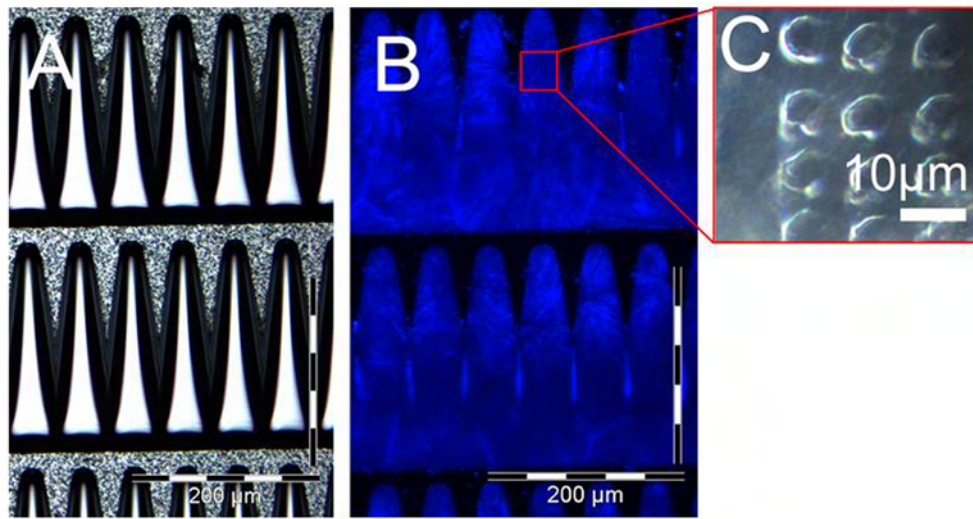


Abbildung 5.30: Peptidpräparation mit Zellpuffer 2 auf geätzttem Silizium Wafer (A) Lichtmikroskopische Aufnahme (Phasenkontrast = PhaKo) der Oberfläche eines Silizium Wafers mit Sägezahnstruktur. (B) Präparation des Silizium Wafers mittels Zellpuffer 2 (Autofluoreszenz von 2,5-DHB, blau). Die Abbildung zeigt die Kristallisation von 2,5-DHB in Form feiner Nadeln. (C) Zusätzliche PhaKo Aufnahme eines Ausschnitts zur Verdeutlichung des Kristallisationsverhaltens (500-fache Vergrößerung). Die kreisförmigen Vertiefungen sind durch Laserdesorption verursacht ( $\approx 8 \mu\text{m}$  Ø).

sucht. Die Ergebnisse dieser rasternden massenspektrometrischen Untersuchung sind in Abbildung 5.31 (S.158) dargestellt. Die effektive laterale Auflösung betrug hierbei  $\approx 8 \mu\text{m}$  Ø. Die lichtmikroskopische Abbildung 5.31 A (S.158) verdeutlicht den abgerasterten Bereich. Die Mikrostrukturen wurden durch den Zellpuffer exakt ausgefüllt. Durch die blaue Autofluoreszenz des 2,5-DHB zeigt Abbildung 5.31 B (S.158) die Verteilung noch deutlicher an. Es wurden zwei massenspektrometrische Verteilungsbilder erzeugt, die die Verteilung des  $[\text{M}+\text{H}]^+$ - und des  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ -Ions zeigen. Bei Betrachtung der Verteilungsbilder fallen leichte Unterschiede in der Verteilung der beiden Ionen auf. Während das  $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Ion sehr homogen über den gesamten Präparationsbereich verteilt ist, tritt das  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ -Ion in der rechten Hälfte in höherer Konzentration auf. Dennoch ist das  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ -Ion im gesamten Präparationsbereich vertreten.

### MS<sup>2</sup>:

Die Identifikation peptidischer Biomoleküle ist durch Fragmentationenanalysen (MS<sup>2</sup>) möglich. Durch die Untersuchung präparierter, strukturierter artifizieller Oberflächen mittels MS<sup>2</sup> wurde zunächst ein bekanntes System gewählt. Eine der ersten Untersuchungen fand an einer Präparation mit dem synthetischen Peptid His-Val-Gln-Asp-Leu-Asp-Met-Asn-Leu in Zellpuffer 2 statt. Die

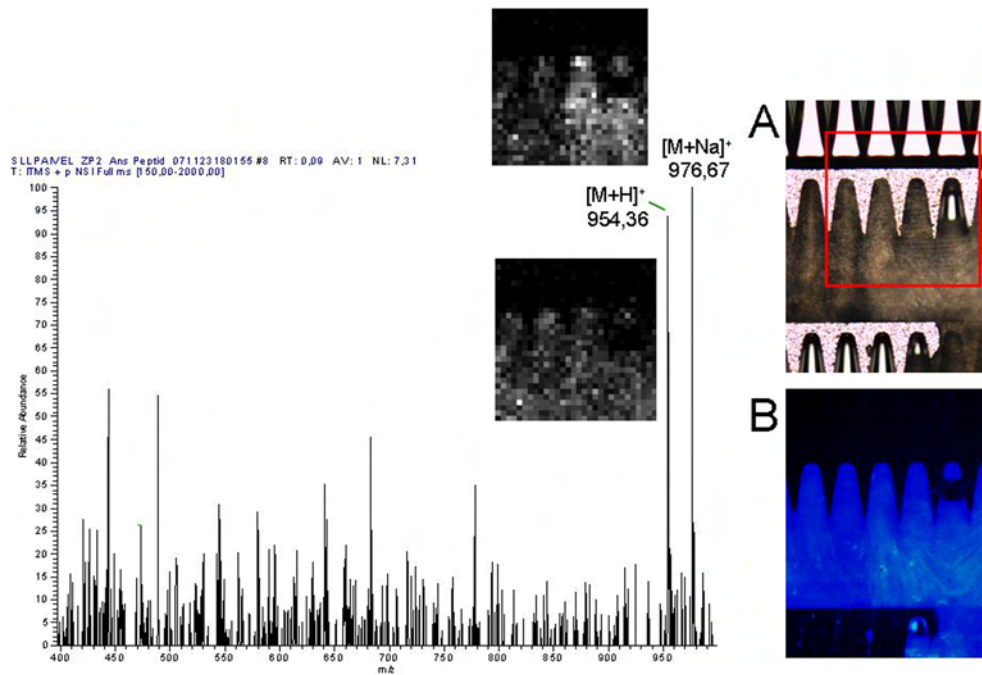


Abbildung 5.31: Peptidpräparation (geätzter Silizium Wafer), SMALDI *image* (Einzelschussspektren, MS<sup>1</sup>, LTQ MS)

Massenspektrum des synthetischen Peptids SLLPAIVEL ( $[M+H]^+$ ,  $m/z$  954,36 Da,  $[M+Na]^+$ ,  $m/z$  976,67 Da;  $4 \cdot 10^{-6}$  mol/L) präpariert in Zellpuffer 2. Massenspektrometrische Verteilungsbilder des Peptids, oben:  $[M+Na]^+$ , unten:  $[M+H]^+$ . (A) Lichtmikroskopische Aufnahme (HF) des abgerasterten Bereiches (rotes Quadrat).  $30 \times 30$  Pixel,  $7,44 \mu\text{m}$  Pixelkantenlänge, effektive laterale Auflösung  $\approx 8 \mu\text{m}$  Ø. (B) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (Autofluoreszenz von 2,5-DHB, blau).

Messung wurde nach Modifikation der Steuersoftware MCP durchgeführt, so dass mehrere Einzelschussspektren pro Probenposition erzeugt werden konnten. Zusätzlich wurde die *imaging* Software Mirion modifiziert, um die erzeugten Einzelschussspektren derselben Probenposition nachfolgend summieren zu können. Die auf der Basis der Untersuchung erstellten massenspektrometrischen Verteilungsbilder der Fragmentionen sind in Abbildung 5.32 (S.159) dargestellt. Die effektive laterale Auflösung liegt bei  $\approx 7,3 \mu\text{m}$  Ø. Die Untersuchung zeigt, dass die Fragmentionenanalyse von Peptiden, unter Summierung der Einzelschussspektren und einer effektiven lateralen Auflösung  $< 8 \mu\text{m}$ , möglich ist. Trotz der feinen Oberflächenstruktur wurde eine fast durchgehende b-Fragmentionenserie erzeugt, während y-Fragmentionen weniger häufig entstanden. Interessant ist die Beobachtung, dass die Signalintensität beim jeweils dritten Spektrum derselben Position merklich sinkt. Dies trifft vor allem dann zu, wenn das erste Spektrum eine hohe Signalintensität aufweist. Dies gibt Hinweise auf die mögliche Anzahl von Laserpulsen, die auf eine Probenposition, bei



derart hoher Laserfokussierung, abgegeben werden können und die Gefahr der massenspektrometrischen Tiefenprofilierung der Probe.

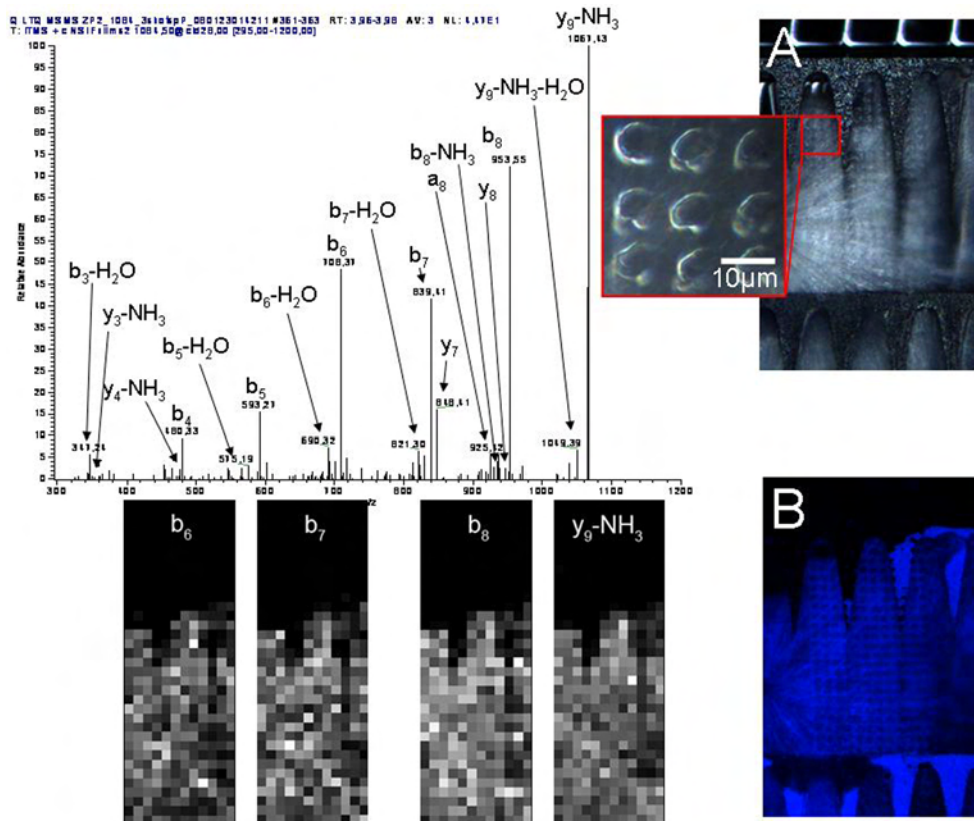


Abbildung 5.32: Peptidpräparation (geätzter Silizium Wafer), SMALDI *images* (Einzelschussspektren summiert,  $MS^2$ , LTQ MS)

$MS^2$  Summenspektrum eines synthetischen Peptids (SLC: HVQDLDMNL,  $[M+H]^+$ ,  $m/z$  1084,51 Da) mit b- und y-Fragmenten (Massenbereich  $m/z$  295–1200 Da). Die Konzentration des Peptids betrug  $7 \cdot 10^{-6}$  mol/L. Verteilungsbilder der Fragmentationen (von links nach rechts):  $b_6$ ,  $b_7$ ,  $b_8$  und  $y_9-NH_3$ . (A) Lichtmikroskopische Aufnahme (PhaKo) des abgerasterten Bereiches ( $12 \times 35$  Pixel;  $9,92 \mu m$  Pixelkantenlänge; 3 Einzelschussspektren/Pixel). Die vergrößerte lichtmikroskopische Aufnahme demonstriert die effektive laterale Auflösung. Diese beträgt  $\approx 7,3 \mu m$  Ø. (B) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (Autofluoreszenz von 2,5-DHB, blau).

### 5.7.3.2 FT MS Untersuchungen

#### $MS^1$ :

Die bereits beschriebene MALDI Präparation aus Zellpuffer 2 und zwei Peptiden (Bradykinin 1-7, Angiotensin II), modifiziert durch ein TEM Gitter, wurde nochmals rasternd mit dem FT MS untersucht. Dabei wurde eine effektive laterale Auflösung von  $\approx 7,5 \mu m$  Ø erzielt. Die dabei desorbierte Probenmen-

ge entspricht ebenfalls  $39 \cdot 10^{-18}$  mol/Pixel. Die Ergebnisse zeigen ein weniger kontrastreiches *image* auf der Basis erzeugten FT MS Daten, als es auf LTQ MS Datenbasis möglich war. Zudem konnte lediglich ein Verteilungsbild für Angiotensin II erstellt werden (siehe Abb.5.33, S.160). Das in der Abbildung aufgeführte Massenspektrum verdeutlicht das niedrige Ionensignal im FT-ICR Massenanalysator. Bei gleicher lateraler Auflösung entstanden die LTQ MS *images*. Die Untersuchung dieser MALDI Probe ist ein weiteres Indiz für die niedrigere Empfindlichkeit des FT-ICR MS. Dennoch konnte ein massenspektrometrisches Verteilungsbild, unter den gegebenen Bedingungen (Ionenmenge, Einzelschussspektren), auf dem FT-ICR MS in der Konfiguration von 2005 erzeugt werden. Die Massengenauigkeit betrug dabei 16,6ppm.

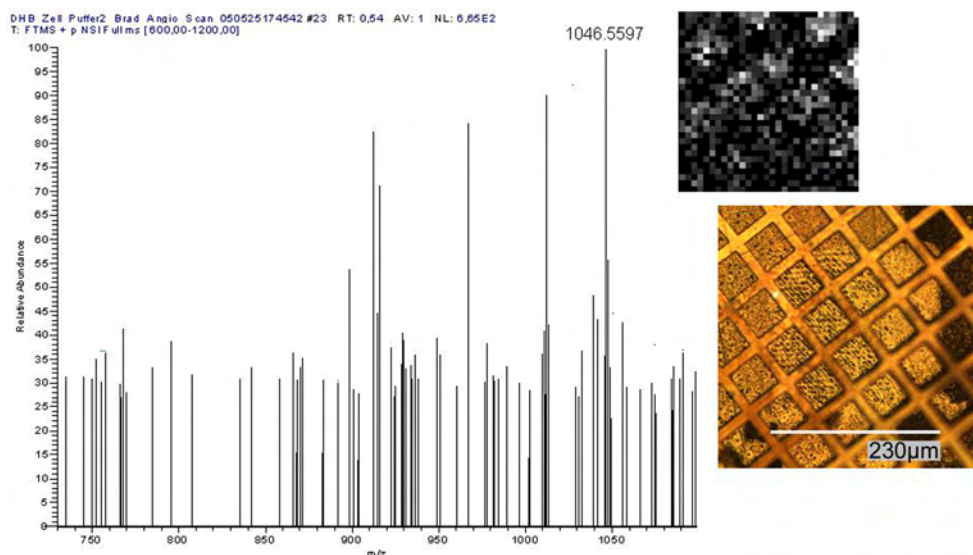


Abbildung 5.33: Strukturierte Peptidpräparation, SMALDI *image* (Einzelschussspektren,  $MS^1$ , FT MS)

FT MS Massenspektrum und Verteilungsbild von Angiotensin II ( $[M+H]^+$ ,  $m/z$  1046,5597 Da). Das lichtmikroskopische Bild zeigt den abgerasterten Probenbereich, der durch ein TEM Gitter (lichte Weite  $42 \mu m$ , Stegbreite  $12 \mu m$ ) strukturell modifizierten Peptidpräparation.  $30 \times 30$  Pixel;  $8,06 \mu m$  Pixelkantenlänge; effektive laterale Auflösung  $\approx 7,5 \mu m$  Ø; voreingestellte Massenauflösung 50000; Massenbereich  $m/z$  600-1200 Da; Massengenauigkeit 16,6 ppm.

#### 5.7.4 *Bioprinted molecules* – massenspektrometrische Untersuchung gedruckter, biomolekularer Proben

Durch die Verwendung des CHIP (engl.: *chemical inkjet printer*) Druckers war es möglich, beliebige Muster von Matrix-Analytlösungen auf die Oberfläche eines Edelstahl MALDI Probenträgers aufzubringen. Als Analytsubstanzen wurden Membranlipid- und Peptidgemische verwendet. Ihre Zusammensetzung und die verwendeten Lösungsmittel sind in Kapitel 4.8.3 (S.78) aufgeführt.

##### 5.7.4.1 Membranlipide

###### 5.7.4.1.1 LTQ MS Untersuchungen

###### MS<sup>1</sup>:

Als erste Substanzklasse wurden die Membranlipide untersucht. Wie im Kapitel 4.8.3 (S.78) beschrieben, wurde neben der in der Drucklösung enthaltenen Matrix zusätzlich Matrix mittels *Airspray* appliziert. Die Membranlipidlösung enthielt Cholesterin und Phosphatidylcholin 34:1 (PC 34:1) und wird im Folgenden auch als Lipidmix bezeichnet. Die entstandenen Spektren sind komplex und durch den metastabilen Zerfall von PC 34:1 bestimmt. Dabei werden mitunter Carbeniumionen ( $[\text{PC}-(\text{lange Fettsäure})]^+$ ) gebildet. Jedoch wird der Zerfall des PC 34:1 vor allem durch die Abspaltung der Phosphocholin-Kopfgruppe ( $[\text{Phosphocholin}+\text{H}]^+$ ,  $m/z$  184,07 Da) bestimmt. Im noch folgenden Abschnitt (MS<sup>2</sup>, S.163) wird das komplexe Fragmentierungsmuster verdeutlicht. Teilweise treten die Fragmente mit sehr niedriger Intensität auf. Das Cholesterin erscheint vor allem als  $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ -Ion ( $m/z$  369,33 Da) in den Spektren.

Die Druckpunkte der Probe mittels CHIP Drucker zeigten relativ große Niveauunterschiede, verursacht durch kreisförmige Kristallisation. Die Druckpunkte sehen wie miniaturisierte Vulkankrater aus („Druck-Krater“). Um die Krater herum ist die Analytlösung teilweise verlaufen. Die lichtmikroskopische Hellfeldaufnahme (Abb.5.34 A) zeigt den abgerasterten Bereich auf der 20 nL Lipidprobe, verdeutlicht durch ein rotes Rechteck. Die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (Abb.5.34 B) des abgerasterten Bereiches zeigt auch nach der Untersuchung eine deutliche Autofluoreszenz des 2,5-DHB (Kraterrand und dessen Außenseiten). Die Probe bzw. Matrix wurde hier nicht vollständig desorbiert. Die Ergebnisse der rasternden Untersuchung sind in Abbildung 5.34 (S.162 C-H) dargestellt.

Das massenspektrometrische Verteilungsbild Abb.5.34 C zeigt die Verteilung des  $[\text{PC}]^+$ -Ions. Das Ion ist, von einigen Bereichen abgesehen, relativ homogen verteilt. Die Verteilung drückt das Verlaufen der Probe während des Druckvor-

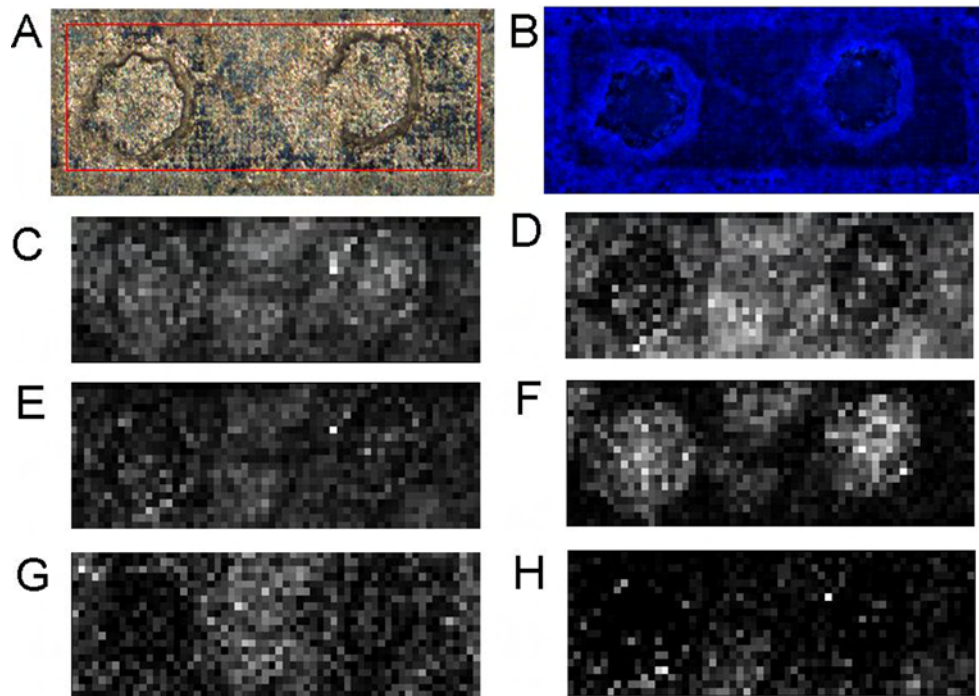


Abbildung 5.34: Gedruckte Lipidmuster, SMALDI *images* (Einzelschussspektren summiert, MS<sup>1</sup>, LTQ MS)

Lichtmikroskopische Aufnahmen des untersuchten Probenareals und erzeugte Verteilungsbilder der Probe (Phosphatidylcholin 34:1 (PC) [M]<sup>+</sup>,  $m/z$  760,50 Da; Cholesterin [M-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup>,  $m/z$  369,33 Da). (A) Lichtmikroskopische Aufnahme (HF) des abgerasterten Probenbereiches (rotes Rechteck). (B) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (Autofluoreszenz 2,5-DHB, blau). *images*: (C) [PC]<sup>+</sup>, (D) [PC-H+Na]<sup>+</sup>, (E) [PC+DHB-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>, (F) [2PC+e<sup>-</sup>]<sup>+</sup>, (G) [Cholesterin-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup> und (H) [Phosphocholin+H]<sup>+</sup>. 20×60 Pixel; 12,41  $\mu$ m Pixelkantenlänge; 2 Einzelschussspektren/Pixel; Massenbereich  $m/z$  150-2000 Da.

ganges aus, da auch zwischen den „Druck-Kratern“ ein flächiges Signal auftritt. Vergleicht man die Verteilung des [PC]<sup>+</sup>-Ions mit der des [PC-H+Na]<sup>+</sup>-Ions (Abb.5.34 D) und des [PC+DHB-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>-Ions (Abb.5.34 E), so ist vor allem innerhalb der „Druck-Krater“ ein Unterschied festzustellen. Dort nimmt die Intensität des Alkali- bzw. Matrixadduktions ab, während dieser Unterschied im Bereich zwischen den „Druck-Kratern“ nicht zu erkennen ist. Bei Betrachtung des PC-Dimers (Abb.5.34 F) fällt die diskrete Verteilung im Innern der „Druck-Krater“, sowie in Form drei weiterer Flecken auf. Ein Fleck befindet sich im linken, oberen Eck, sowie zwei zwischen den „Druck-Kratern“. Die Verteilung des [Cholesterin-H<sub>2</sub>O+H]<sup>+</sup>-Ions (Abb.5.34 G) korreliert relativ gut mit der Verteilung des Natriumadduktions von PC 34:1, was den mittleren Teil des untersuchten Areals angeht. Jedoch ist innerhalb der „Druck-Krater“, sowie zu den Rändern hin, nur ein sehr verstreutes Massensignal festzustellen. Choleste-

rin zeigt kein deutliches Massensignal von den Graten der „Druck-Krater“. Die Kopfgruppe des PC 34:1, das Phosphocholin (Abb.5.34 H), zeigt im unteren Teil des Untersuchungsbereichs eine ähnliche Verteilung wie das  $[\text{PC}+\text{DHB}-\text{H}_2\text{O}]^+$ -Ion.

### MS<sup>2</sup>:

Die MS<sup>2</sup> Untersuchung von Phosphatidylcholin 34:1 ist aus mehreren Gründen schwierig. Deshalb wurden in dieser Hinsicht keine rasternden Untersuchungen durchgeführt. Die Phosphocholin-Kopfgruppe tritt bereits regelmäßig bei normalen MS Untersuchungen auf, ohne dass CID angewendet werden muss (siehe Abb.5.34 H, S.162) und stellt das Hauptfragment des PC 34:1.

Die möglichen Fragmentionen des PC 34:1 wurden deshalb durch eine lineare MS<sup>2</sup> Untersuchung ermittelt. Das Fragmentierungsverhalten ist im MS<sup>2</sup> Spektrum in Abbildung 5.35 (S.163) ersichtlich. Es handelt sich um ein Summenspektrum aus 814 Einzelspektren und verdeutlicht die untergeordnete Rolle der weiteren Fragmentionen neben dem Phosphocholin-Fragmention.

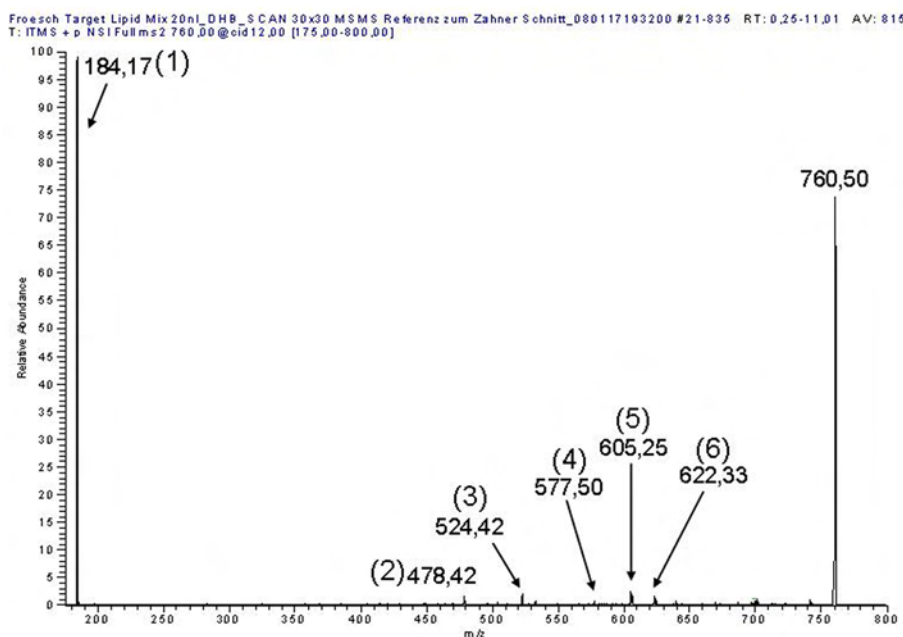


Abbildung 5.35: Gedrucktes Lipidmuster, MALDI (Einzelschusspektren, MS<sup>2</sup>, LTQ MS)

MS<sup>2</sup> Summenspektrum von Phosphatidylcholin (PC) 34:1 ( $[\text{M}]^+$ , m/z 760,50 Da). (1) Hauptfragment: Phosphocholin-Kopfgruppe ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ; m/z 184,08 Da). Weitere Fragmente: (2)  $[\text{PC}-(\text{lange Fettsäure})]^+$ , (3)  $[\text{PC}-(\text{kurze Fettsäure})+\text{H}_2\text{O}-\text{H}]^+$ , (4)  $[\text{PC}-183+\text{H}]^+$ , (5)  $[\text{PC}-(\text{Bruchstück ungesättigte Fettsäure})]^+$  (6)  $[\text{PC}-(\text{Bruchstück ungesättigte Fettsäure})+\text{H}_2\text{O}]^+$ . Massenbereich m/z 175-800 Da.

#### 5.7.4.1.2 FT MS Untersuchungen

##### MS<sup>1</sup>:

Rasternde FT MS Untersuchungen der gedruckten Lipidmuster wurden zwar durchgeführt, jedoch entstanden dabei im Einzelschussbetrieb keine hinreichend guten Verteilungsbilder. Die Untersuchungen konnten bei Einzelschussbetrieb lediglich im SIM Modus durchgeführt werden. Eines der wenigen dabei entstandenen Massenspektren von Phosphatidylcholin 34:1 ( $[M]^+$ ,  $m/z$  760,5856 Da), mit einer Massengenauigkeit von 1,8ppm, zeigt Abbildung 5.36 (S.164).

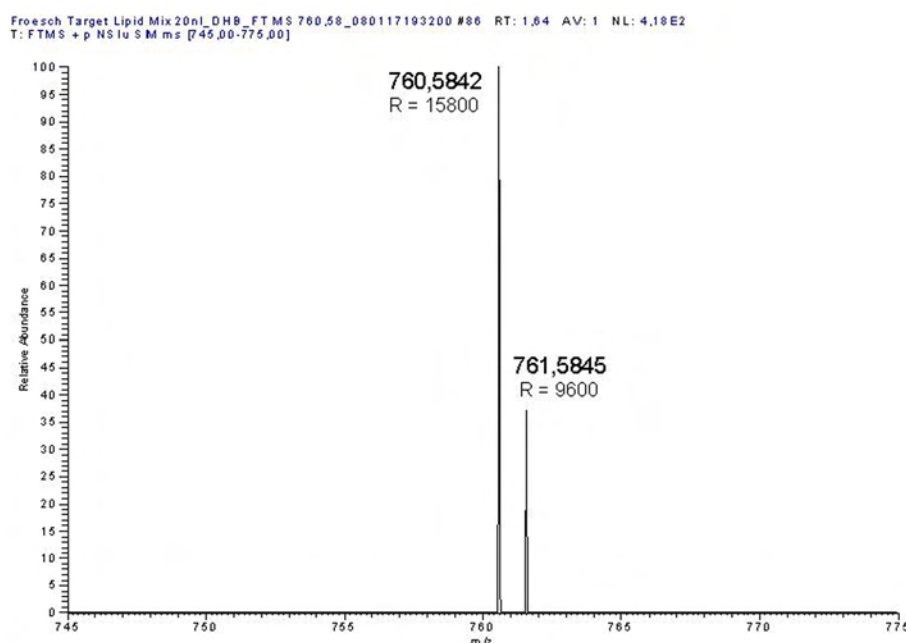


Abbildung 5.36: Gedrucktes Lipidmuster, MALDI Spektrum (Einzelschusspektren, MS<sup>1</sup>, FT MS)

Einzelschusspektrum von Phosphatidylcholin (PC) 34:1 ( $[M]^+$ , theoretisches  $m/z$  760,5856 Da). SIM Modus (Massenbereich  $m/z$  745-775 Da), voreingestellte Massenauflösung 25000, Massengenauigkeit 1,8 ppm.

#### 5.7.4.2 Peptide

##### 5.7.4.2.1 LTQ MS Untersuchungen

##### MS<sup>1</sup>:

Die Ergebnisse der rasternden Untersuchung eines gedruckten Peptidgemisches, mit Bradykinin 1-5, Angiotensin II und Neurotensin (sowie ACTH und Bovines Insulin B-Kette, Massen liegen außerhalb des Messbereiches), sind in Abbildung 5.37 (S.166) wiedergegeben. Die lichtmikroskopische Aufnahme (Abb.5.37 A)

zeigt den Probenbereich nach der Untersuchung. Das rote Rechteck verdeutlicht den abgerasterten Probenbereich. Der erhabenen krater- bzw. U-förmige Druckpunkt der Probe ist als Überrest erkennbar. Die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (Abb.5.37 B) verdeutlicht die Verteilung des 2,5-DHB durch dessen blaue Autofluoreszenz. Die Aufnahme zeigt eine niedrigere, aber immer noch vorhandene, Autofluoreszenz des 2,5-DHB innerhalb des abgerasterten Areals. Die Matrix wurde dort also nicht vollständig desorbiert. Die linke Hälfte des Druckpunktes ist noch gut erhalten, die rechte wurde nahezu vollständig desorbiert. Die massenspektrometrischen Verteilungsbilder der  $[M+H]^+$ -Ionen (Abb.5.37 C: Bradykinin 1-5, Abb.5.37 D: Angiotensin II, Abb.5.37 E: Neurotensin) zeigen eine diskrete, teilweise flächige Verteilung der aufgedruckten Peptide. Im Gegensatz zu den Lipiden verliefen die Druckpunkte während der Präparation hier nur sehr wenig.

Die intensivsten, flächigen Signalintensitäten von Bradykinin 1-5 und Angiotensin II (Abb.5.37 C und D) treten im linken bzw. linken-unteren Teil innerhalb des „Druck-Kraters“ auf. Das Bradykinin 1-5 Signal erstreckt sich dabei kontinuierlich bis in die Fläche innerhalb des „Druck-Kraters“. Dabei ist es auch an Stellen auf der Außenflanke des Grates aufzufinden, die über den erkennbaren Bereich im optischen Referenzbild hinausgehen. Das *image* des Bradykinin 1-5 beinhaltet also Informationen, die über die in den mikroskopischen Referenzaufnahmen hinausgehen.

Die Ausdehnung des Bereiches in dem Massensignale der anderen Peptide auftauchen ist schwierig zu definieren, erkennbar ist jedoch, dass diese insgesamt deutlich weniger kontinuierlich auftreten als das Bradykinin 1-5 Signal. Die Signalintensität des Neurotensins (Abb.5.37 E) gibt zwar immer noch die Lage des Druckpunktes, jedoch nicht mehr dessen Form wieder. Dies korreliert direkt mit den unterschiedlichen Konzentrationen der Peptide in der gedruckten Analytlösung (Bradykinin 1-5 höchste, Neurotensin niedrigste Konzentration).

### MS<sup>2</sup>:

Nach der erfolgreichen Durchführung von MS<sup>2</sup> Untersuchungen mit voreingestellter zu fragmentierender Masse, wurden nun zusätzlich MS<sup>2</sup> Messungen im *data dependent*-Modus erprobt. Der *data dependent*-Modus (siehe Thermo Electron Corporation (2003)) erlaubt die vollautomatische MS<sup>2</sup> Untersuchung einer Probe, indem aus einem Vorläuferionenspektrum jeweils das oder die intensivsten *m/z*-Signale automatisch ausgewählt und fragmentiert werden. Voraussetzung sind also ausreichend gute Vorläuferionen- sowie Folgespektren während der Probenuntersuchung. Bei MALDI Proben, die keine homogene Oberflächen-



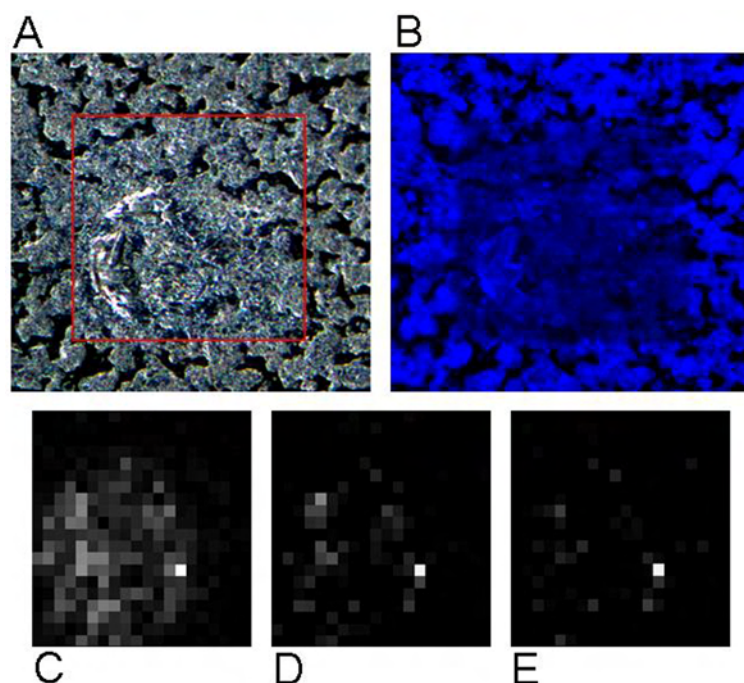


Abbildung 5.37: Gedrucktes Peptidmuster, SMALDI *image*, (Einzelschussspektren,  $MS^1$ , LTQ MS)

Lichtmikroskopische Aufnahmen und Verteilungsbilder der Probe (Peptidmix 5 nL) mit Bradykinin 1-5 ( $[M+H]^+$ ,  $m/z$  573,33 Da), Angiotensin II ( $[M+H]^+$ ,  $m/z$  1046,50 Da) und Neurotensin ( $[M+H]^+$ ,  $m/z$  1673,00 Da). (A) Lichtmikroskopische Aufnahmen (PhaKo) (Probenbereich nach rasternder Untersuchung, rotes Rechteck). (B) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (Autofluoreszenz 2,5-DHB, blau). *images*: (C) Bradykinin 1-5  $[M+H]^+$ , (D) Angiotensin II  $[M+H]^+$ , (E) Neurotensin  $[M+H]^+$ .  $20 \times 20$  Pixel;  $8,68 \mu m$  Pixelkantenlänge; Einzelschussspektrum/Pixel; Massenbereich  $m/z$  150-2000 Da.

struktur aufweisen, ergibt sich häufig das Problem einer schwankenden Signalintensität des Analyten in aufeinander folgenden Spektren. Die schwankende Signalintensität kann z.B. zur Auswahl von Matrixionen zur Fragmentierung führen, da deren Signale am intensivsten sind. Jedoch können Untersuchungen im *data dependent*-Modus auch bei solchen Proben erfolgreich sein, wie das Einzelschussspektrum in Abbildung 5.38 (S.167) zeigt. Hier wurde Bradykinin 1-5 im Vorläuferionenspektrum als intensivstes Signal bestimmt. Die folgende Fragmentierung ergab das  $b_4$ - und  $y_4$ -Fragment.

#### 5.7.4.2.2 FT MS Untersuchungen

$MS^1$ :



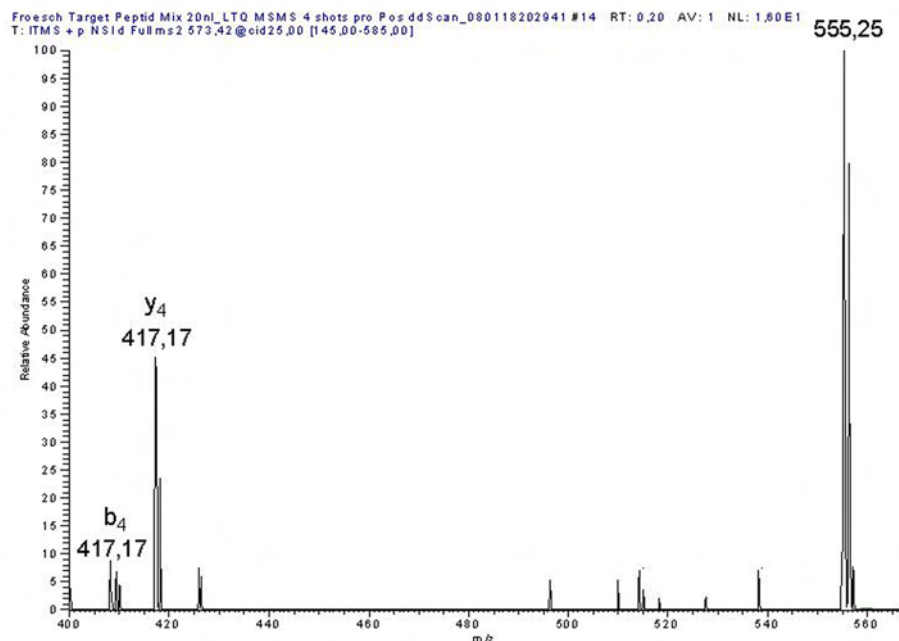


Abbildung 5.38: Gedrucktes Peptidmuster, MALDI Spektrum (Einzelschusspektrum, MS<sup>2</sup>, *data dependent*-Modus, LTQ MS)

MS<sup>2</sup> Einzelschusspektrum im *data dependent*-Modus (Peptidmix 20 nL). Fragmentionenspektrum von Bradykinin 1-5 ( $[M+H]^+$ ,  $m/z$  573,42 Da,  $[M-H_2O+H]^+$ ,  $m/z$  555,25 Da), Massenbereich  $m/z$  145-585 Da.

Durch eine Modifikation des USB-Controllers konnten erstmals rasternde FT MS Untersuchungen der gedruckten Biomolekülmuster durchgeführt werden. Die Modifikation ermöglicht mehrere Laserpulse auf eine Probenposition, bei verlängerter Öffnungszeit (IT) der LTQ, zu emittieren und die entstehenden Ionen zu sammeln. Spektren können also auf der Basis einer größeren Ionenmenge erstellt werden. Die so von den gedruckten Biomolekülmustern erzeugte Ionenmenge war nun auch für den unempfindlicheren FT-ICR Massenanalysator ausreichend. Die Ergebnisse einer rasternden FT MS Untersuchung werden in Abbildung 5.39 (S.168) dargestellt. Die lichtmikroskopische Aufnahme (PhaKo; siehe Abb.5.39 A, S.168) verdeutlicht zusätzlich den abgerasterten Bereich durch ein rotes Rechteck. Die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (Abb. 5.39 B) zeigt die übrig gebliebene Verteilung von 2,5-DHB durch dessen blaue Autofluoreszenz. Die *images* zeigen die Verteilung von Bradykinin 1-5 (Abb. 5.39 C) und Angiotensin II (Abb.5.39 D). Den *images* liegen dabei Spektren mit einer Massengenauigkeit von 1,5ppm (Bradykinin 1-5) bzw. 0,4ppm (Angiotensin II) zugrunde. Die Analytverteilung ist sehr diskret und beschränkt sich nahezu ausschließlich auf den Bereich der „Druck-Krater“. Die beiden lichtmikro-

skopischen Aufnahmen zeigen die nahezu vollständige Desorption der Matrix. Lediglich der Kraterrand selbst und auf einer Fläche oben rechts sind noch Matrixreste erkennbar. Das Verteilungsbild des Matrixdimers mit abgespaltenem Wasser ( $[2M-2H_2O+H]^+$ ) entspricht der lichtmikroskopischen Matrixverteilung (Verteilungsbild nicht gezeigt).

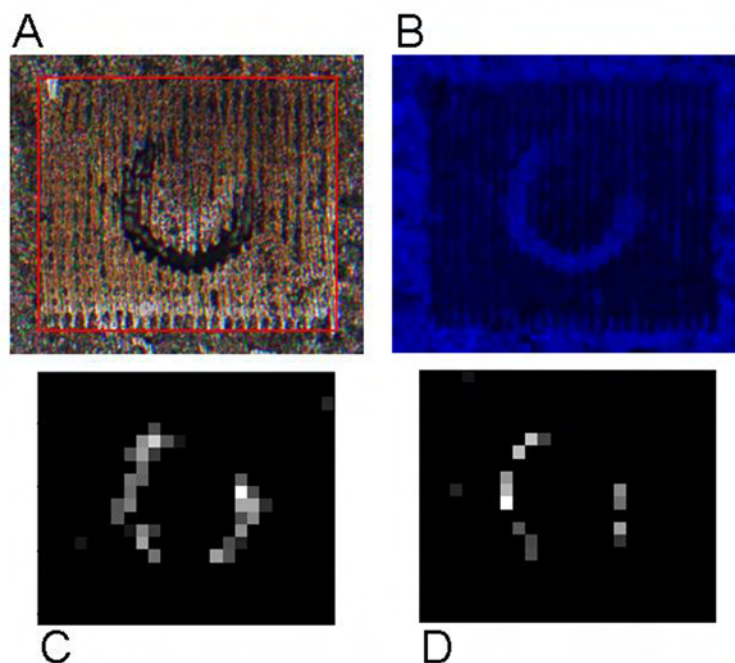


Abbildung 5.39: Gedrucktes Peptidmuster, SMALDI *image*, (Multischussspektren,  $MS^1$ , FT MS)

Lichtmikroskopische Aufnahmen und Verteilungsbilder der Probe (Peptidmix 20 nL). (A) Lichtmikroskopische Aufnahme (HF, Probenbereich nach rasternder Untersuchung, rotes Rechteck). (B) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (Autofluoreszenz 2,5-DHB, blau). *images*: (C) Bradykinin 1-5 ( $[M+H]^+$ ,  $m/z$  573,3140 Da; Massengenauigkeit 1,5ppm), (D) Angiotensin II ( $[M+H]^+$ ,  $m/z$  1046,5419 Da; Massengenauigkeit 0,4ppm).  $20 \times 24$  Pixel;  $8,68 \mu m$  Pixelkantenlänge; Multischussspektrum (5 Laserpulse/(Spektrum\*Pixel); Massenbereich  $m/z$  200-1100 Da; vor-eingestellte Massenauflösung 50000).

Die Untersuchung des niedriger konzentrierten 5 nL Peptidmusters war ebenfalls mit dem modifizierten USB-Controller am FT-ICR MS möglich. Dabei wurden fünf aufeinander folgende Laserpulse/Probenposition emittiert und die entstandenen Ionen gesammelt analysiert. Die rasternde Untersuchung musste dennoch im empfindlicheren SIM-Modus erfolgen. In Abbildung 5.40 (S.169) werden die Ergebnisse der rasternden Untersuchung dargestellt. Hier sind, neben der lichtmikroskopischen Aufnahme des abgerasterten Bereiches (5.40 A),

zwei massenspektrometrische Verteilungsbilder (Abb.5.40 B und C) aufgeführt. Wiederum fallen starke Niveauunterschiede im Profil der Probe auf. Die lichtmikroskopische Aufnahme zeigt eine vollständige Desorption der Matrix auf der Fläche neben dem eigentlichen Druckpunkt.

Bradykinin 1-5 (siehe Abb.5.40 B) ist auf dem Oval des gesamten „Druck-Kraters“ zu finden, weißt aber eine besonders hohe Konzentration im rechten Ovalbereich auf. Insgesamt ist die Verteilung diskontinuierlich. Die Massengenauigkeit der Untersuchung beträgt für Bradykinin 1-5 1,4ppm, für das Matrix-Clusterion 26ppm.

Durch den SIM-Modus wurde lediglich der Massenbereich  $m/z$  558-588 Da untersucht. Aus diesem Grund kann hinsichtlich der Matrix nur die Verteilung des  $[4\text{DHB-2H}_2\text{O}]^{\bullet+}$ -Ions (siehe Abb.5.40 C) beschrieben werden. Das Ion ist im gesamten Ovalbereich (Grat und Seitenflanken des „Druck-Kraters“) recht homogen vertreten, jedoch nicht innerhalb des Ovals.

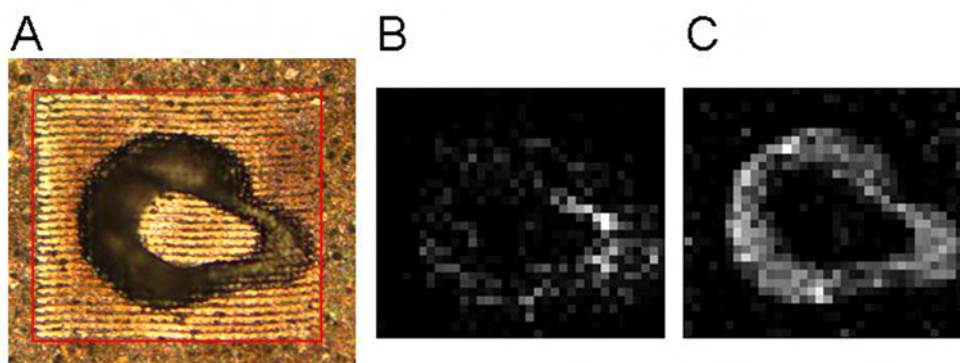


Abbildung 5.40: Gedrucktes Peptidmuster, SMALDI *images*, (Multischussspektren,  $\text{MS}^1$ , FT-SIM MS)

Lichtmikroskopische Aufnahme und Verteilungsbilder der Probe (Peptidmix 5 nL). (A) Lichtmikroskopische Aufnahme (HF; Probenbereich nach rasternder Untersuchung, rotes Rechteck). *images*: (B) Bradykinin 1-5 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $m/z$  573,3141 Da; Massengenauigkeit 1,4ppm), (C) Matrix-Cluster ( $[\text{4DHB-2H}_2\text{O}]^{\bullet+}$ ,  $m/z$  580,1006 Da; Massengenauigkeit 26ppm).  $35 \times 30$  Pixel;  $8,68 \mu\text{m}$  Pixelkantenlänge; Multischussspektrum ( $5 \text{ Laserpulse}/(\text{Spektrum} \times \text{Pixel})$ ); Massenbereich  $m/z$  558-588 Da; voreingestellte Massenauflösung 50000.

### $\text{MS}^2$ :

Abschließend wurden FT  $\text{MS}^2$  Analysen an der 20 nL Peptidmix-Probe durchgeführt (siehe Abb.5.41, S.171). Die beiden lichtmikroskopischen Aufnahmen (Abb.5.41 A und B) zeigen eine uneinheitliche Desorption der Matrix von der Fläche um den „Druck-Krater“ herum. Während diese auf dreiviertel des abgerasterten Bereiches nahezu vollständig desorbiert wurde, ist in einem Viertel

(links im Bild) noch merklich Matrix vorhanden. Der „Druck-Krater“ selbst zeigt ebenfalls eine große Restmenge an Matrix (starke Autofluoreszenz von 2,5-DHB). Die vergrößerte, lichtmikroskopische Aufnahme der Desorptionssorte vermittelt einen Eindruck der effektiven lateralen Auflösung während der rasternden Untersuchung ( $<10\text{ }\mu\text{m}$ ).

Bei der Fragmentierung konnte nur das  $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ -Ion von Bradykinin 1-5 im FT-ICR Massenanalysator detektiert werden. Dessen inhomogene Verteilung (siehe Abb.5.41 C) beschränkt sich auf einen Teilbereich, etwa von der Spitze bis zur Hälfte des Druckpunktes. Das Analytsignal weist dabei einen nur kleinen Bereich besonders hoher Intensität auf. Dieser befindet sich relativ weit rechts im „Druck-Krater“ und liegt nur etwas oberhalb des Probensträger-niveaus.

#### 5.7.4.2.3 Gemessene Analytmenge der gedruckten peptidischen Biomolekülmuster

Zum Vergleich des Analytverbrauchs der gedruckten peptidischen Proben (5 und 20 nL Peptidmix) wurden die jeweiligen Mengen rechnerisch interpoliert. Hierzu wurde die Fläche der Druckpunkte vermessen und deren Gesamtfläche interpoliert. Die Berechnung der absoluten Analytmenge pro Fläche ergab eine 2,5- statt 4-fache Erhöhung der Analytkonzentration bei den 20 nL Druckmustern, gegenüber den 5 nL Mustern. Die 20 nL Druckmuster haben also mehr an Fläche, als an Höhe zugenommen. Die Höhe kann jedoch nur sehr schwierig bei Berechnungen berücksichtigt werden. Auch wenn die Berechnungen deshalb eine Vereinfachung darstellen (Flächen- statt Volumenbezug) ermöglichen sie dennoch eine Näherung der verbrauchten Analytmenge.

Die Berechnungen ergaben eine verbrauchte Analytmenge von  $\approx 90 \cdot 10^{-18}$  mol (5 nL Druckmuster) bzw.  $\approx 200 \cdot 10^{-18}$  mol (20 nL Druckmuster) pro Pixel (angenommener Desorptions-Laserfokusbereich  $7\text{ }\mu\text{m}$  Ø). Mit dieser Analytmenge konnten sowohl *data dependent* MS<sup>2</sup> Messungen mit dem LTQ MS, als auch MS<sup>1</sup> Messungen (eingeschränkter Massenbereich) mit dem FT MS (FT-ICR Ultra Zelle) durchgeführt werden.

#### 5.7.5 Ergebniszusammenfassung – artifizielle Proben und gedruckte Biomolekülmuster

Die Untersuchungen an artifiziellen, biomolekularen Probenoberflächen, die teilweise durch strukturelle Elemente modifiziert waren, ergaben repräsentative massenspektrometrische Verteilungsbilder mit hoher lateraler Auflösung. Alle Untersuchungen wurden mit einer effektiven lateralen Auflösung  $<8\text{ }\mu\text{m}$  Ø

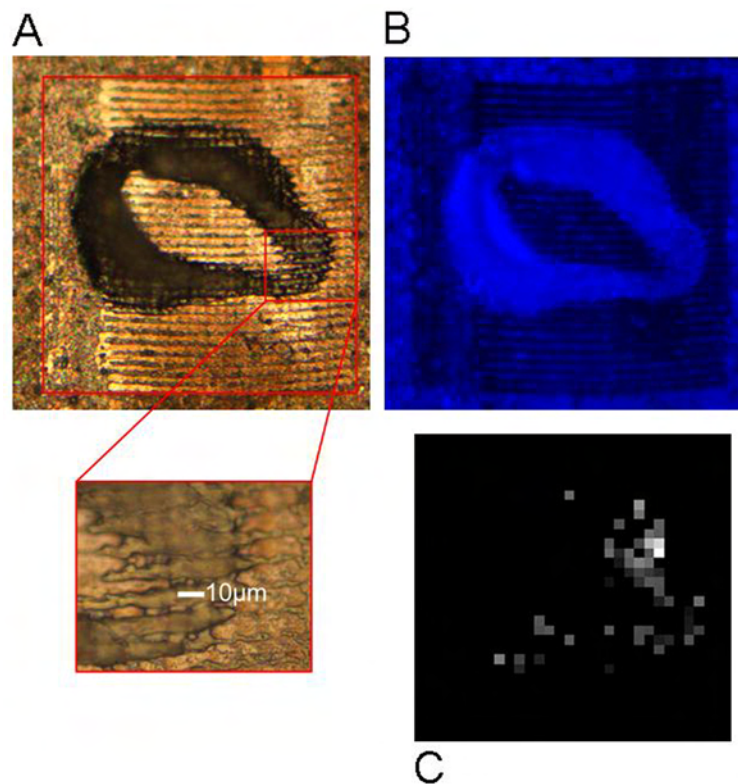


Abbildung 5.41: Gedrucktes Peptidmuster, SMALDI *image* (Multischussspektren,  $MS^2$ , FT MS)

Lichtmikroskopische Aufnahmen und Verteilungsbild der Probe (Peptidmix 20 nL). (A) Lichtmikroskopische Aufnahme (HF; Probenbereich nach rasternder Untersuchung, großes rotes Rechteck) und Vergrößerung der Desorptionsorte (kleines rotes Rechteck). (B) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (Autofluoreszenz 2,5-DHB, blau). *images*: (C) Fragmentation von Bradykinin 1-5 ( $[M-H_2O+H]^+$ ;  $m/z$  555,3031 Da; Massengenauigkeit 2,2ppm).  $35 \times 32$  Pixel;  $9,3 \mu m$  Pixelkantenlänge; Multischussspektrum (6 Laserpulse/(Spektrum\*Pixel)); Massenbereich  $m/z$  125-600 Da; voreingestellte Massenauflösung 25000.

durchgeführt (Bestimmung über Desorptionsorte). Dabei wurden biomolekulare Proben unterschiedlicher Art, Konzentration und Präparation gemessen.

Die Untersuchungen an präparierten, geätzten Silizium Wafern verdeutlichten die Vorteile der Zellpuffer Präparation. Feinste Strukturen der Wafer Oberfläche konnten präpariert werden, ohne dass die sonst bei der Kristallisation von 2,5-DHB entstehenden groben Matrixkristalle die Feinstruktur unkenntlich machten.

Berechnungen des Peptidverbrauchs, zur Aufnahme eines Einzelschussspektrums, ergaben eine Menge von  $40 \cdot 10^{-18}$  mol/(Peptid\*Spektrum). Die Berech-

nungen wurden für eine Bradykinin 1-7 und Angiotensin II *dried droplet* Präparation in Zellpuffer 2 durchgeführt. Weitere Berechnungen an anderen peptidischen Proben ergaben, dass in einem Konzentrationsbereich von  $40\text{-}90 \cdot 10^{-18}$  mol Peptid/Desorptionsort, *images* auf der Basis von Einzelschussspektren mittels LTQ MS erstellt werden konnten. Zellpufferpräparationen ermöglichten dabei empfindlichere Messungen im Vergleich zu Standard MALDI Präparationen.

An artifiziellen peptidischen und lipidischen Proben konnten Fragmentionenanalysen während rasternder Untersuchungen durchgeführt werden. Apparativen Modifikationen des Aufbaus (USB-Controller) führten zu einer Erhöhung der Empfindlichkeit und damit zu weiter gehenden Möglichkeiten bei  $\text{MS}^2$  Untersuchungen. Schließlich konnten  $\text{MS}^2$  Untersuchungen im *data dependent*-Modus mittels LTQ MS und  $\text{MS}^1$  Untersuchungen bzw.  $\text{MS}^2$  Untersuchungen (beide eingeschränkter Massenbereich) am FT MS Ultra durchgeführt werden. Hierfür wurde ein Analytverbrauch/Desorptionsort von  $90\text{-}200 \cdot 10^{-18}$  mol/Pixel berechnet. Dies entspricht einer 2,25- bis 5-fach höheren Analytmenge, die für  $\text{MS}^2$  Messungen im *data dependent*-Modus (LTQ MS) oder  $\text{MS}^1$  bzw.  $\text{MS}^2$  Messungen (FT MS, eingeschränkter Massenbereich) nötig ist.

## 5.7.6 Probenvorbereitung

### 5.7.6.1 Zellproben

Ziel der Probenvorbereitung ist die weitestgehende Erhaltung der intakten Zellmembran. Somit sollen Lipide und Proteine ihre ursprüngliche *in vivo* Position beibehalten. Die mikroskopische Kontrolle der Proben nach den jeweiligen Waschschritten der Probenvorbereitung zeigt, inwiefern eine Prozedur geeignet ist oder nicht. Für die Reinigung der Zellproben wurde zunächst ein isotonischer Puffer aus 0,3M  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in 25 % Ethanol und nachfolgend eine Lösung aus 25 % Ethanol + 0,1 % TFA verwendet. Diese Waschschrritte waren zu stringent für die Zellen (Protokoll 1). Die Folge war eine Ablösung der Zellen vom Substrat sowie eine partielle Zerstörung der Zellmembran, erkennbar an einer öligen Verfärbung des Substrats. Die Änderung des abschließenden Waschschrittes, statt mit 25 % Ethanol + 0,1 % TFA nur mit dest.  $\text{H}_2\text{O}$ , bietet hier eine Verbesserung (Daten nicht gezeigt). Um zusätzlich die Stringenz des primären Waschschrittes zu nehmen wäre die Verwendung einer Waschlösung, ohne osmotisch aktive, anorganische Osmolyte, möglich. Eine wässrige, isotonische D(-)Mannitollösung könnte z.B. als erste Waschlösung verwendet werden. Danach könnte eine Waschung mit max. 10 % Ethanol erfolgen, um auf einen finalen dest.  $\text{H}_2\text{O}$  Schritt vorzubereiten (Protokoll 3, modifiziert).

Die gleichzeitige Anwesenheit von Membranlipiden und Peptiden gilt als



Problem bei der massenspektrometrischen Analyse biologischer Proben. Deshalb wurden Waschschr tte mit stark lipophilen, organischen Lösungsmitteln wie Chloroform oder Aceton + 10 % Eisessig erprobt. Deren desintegrierende Wirkung auf die Lipidmembran wird durch Abbildung 5.42 (S.173) verdeutlicht.

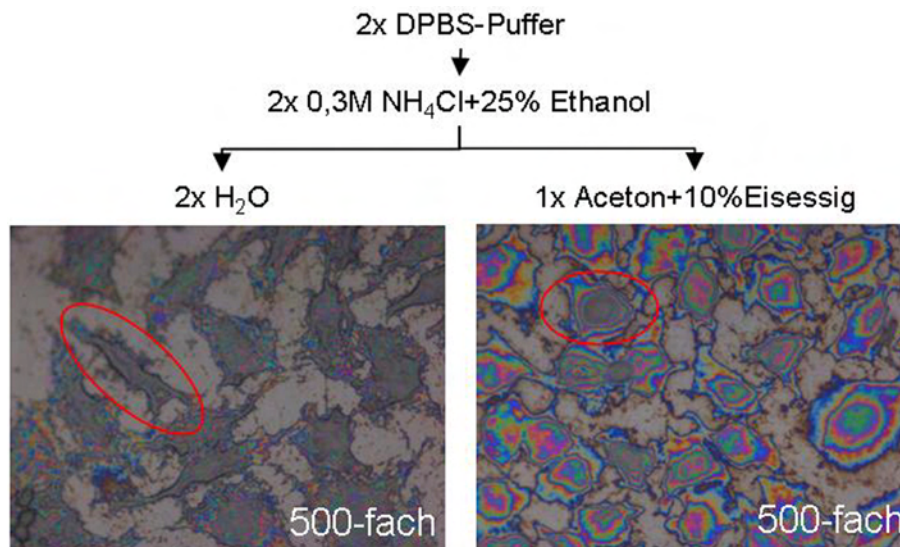


Abbildung 5.42: Vergleich wässriger und lipophiler Zellvorbereitung  
Lichtmikroskopische Aufnahmen unterschiedlicher Zellvorbereitungen. Nach zwei identischen Waschschr tten wird abschließend mit dest. H<sub>2</sub>O oder Aceton + 10 % Eisessig (beides kalt) gewaschen. Die roten Ovale zeigen besondere Auffälligkeiten.

Die mikroskopische Kontrolle der HeLa Zellen, nach abschließender Waschung mit dest. H<sub>2</sub>O oder Aceton + 10 % Eisessig, verdeutlicht die Unterschiede der verwendeten Reinigungsprozeduren (Protokoll 2, modifiziert). Zur Vorbereitung anderer analytischer Verfahren (z.B. REM) wird Aceton + 10 % Eisessig als Gewebefixanz verwendet. Die Anwendbarkeit auf Einzelzellen wird dabei jedoch nicht eingeschlossen, wie Abbildung 5.42 (S.173) verdeutlicht. Die Zellmembran ist nach Einsatz des organischen Lösungsmittelgemisches flächig verlaufen. Hinzu kommt, dass nicht-lipidische Zellbestandteile meist gewegewaschen wurden. Nur teilweise sind diese, als zentrale Präzipitate inmitten einer angedeuteten Zellform, erhalten (siehe Abb.5.42, rechtes rotes Oval). Die abschließende Waschung, statt mit Aceton + 10 % Eisessig mit dest. H<sub>2</sub>O führt zu einer deutlich besseren Erhaltung der ursprünglichen Strukturen (Abb.5.42, linkes rotes Oval) und insgesamt weniger flächiger Verwaschung der Lipidmembran (Protokoll 2). Dennoch ist die mikroskopische Kontrolle der Zellvorbereitung kritisch zu betrachten.  lige Verfärbungen des Untergrundes können auch von Verunreinigungen der verwendeten Lösungsmittel und nicht unbedingt aus

der Lipidmembran stammen.

### 5.7.6.2 Gewebeproben

Gewebe sind robuster als einzelne Zellkulturzellen. Die räumliche Ordnung und Differenzierung von Zellen innerhalb der Gewebe führt zu einem festen Verbund der Zellen, vermittelt durch unterschiedliche Zell-Zell-Verbindungen (*gap junctions*, *tight junctions*, extrazelluläre Matrix) und die Anbindung an das Cytoskelett. Jedoch hat auch hier die Anwendung schwach bis stark lipophiler Lösungsmittel Auswirkungen auf die Neuordnung der Membranlipide, wie die folgenden Ergebnisse zeigen.

Die Ausschnitte von vier präparierten Gewebeschnitten (Muskelgewebe, Mäusezunge) werden in Abbildung 5.43 (S.175) (licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen), nach erfolgter Vorbereitung und Matrixapplikation (*Airspray* oder Zellpuffer) sowie rasternder MS Untersuchung, gezeigt. Die mikroskopischen Aufnahmen verdeutlichen, dass die Schnitte S1 und S2 (Vorbereitung mit Aceton + 10 % Eisessig) nahezu kontinuierlich erhalten, die Schnitte S3 (Vorbereitung mit Chloroform) und S4 (Vorbereitung mit 70 % Ethanol) (Abb.5.43 S3 und S4) jedoch zerrissen sind. Die Anwendung von Aceton + 10 % Eisessig vermied demnach ein Zerreißen der Dünnschnitte, im Gegensatz zu Chloroform oder 70 % Ethanol. Betrachtet man zusätzlich die Aufnahmen der Rattengewebepräparation (Abb.5.46, S.179), die mit 50 % Ethanol gewaschen wurde, fällt auch hier auf, dass der Schnitt durch Dehydratation schrumpfte und kleine Löcher bildete. Bei allen lichtmikroskopischen Aufnahmen fällt an lückenhaften Stellen eine ölige Färbung des Probenträgers auf.

## 5.7.7 Massenspektrometrische Untersuchung biologischer Proben

### 5.7.7.1 Zellproben

#### 5.7.7.1.1 LTQ MS Untersuchungen

##### MS<sup>1</sup>:

Die Probenvorbereitung (Protokoll 2) und -präparation (Zellpuffer 1) einer He-La Probe ergab folgende Ergebnisse. Die Vorbereitung selbst zeigt eine leichte Verbesserung durch die Verwendung von Protokoll 2. Zelluläre Strukturen blieben besser erhalten, jedoch sind nach wie vor lysierte Zellen erkennbar (Daten nicht gezeigt).

Wie in Abbildung 5.24 (S.147) und Abbildung 5.25 (S.147) im Detail zu erkennen, erstarrte bzw. kristallisierte der Zellpuffer über den Zellen in ei-



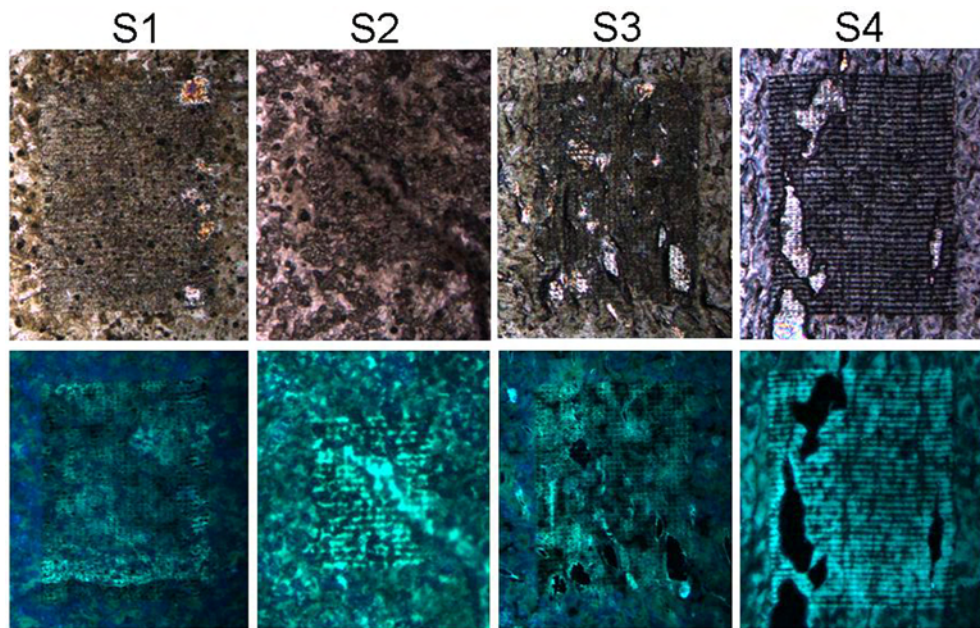


Abbildung 5.43: Mikroskopischer Vergleich unterschiedlicher Vorbereitungen von Rattengewebe

Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von vier Mäusegewebeschnitten (S1-S4). Die vier Schnitte wurden unterschiedlich vorbereitet und präpariert. Probenvorbereitung: S1 und S2, Aceton + 10 % Eisessig; S3, Chloroform; S4 70 % Ethanol. Matrixapplikation: S1 und S3, *Airspray*; S2 und S4, ZP2a und *Airspray*.

ner homogenen, kontinuierlichen Matrixschicht aus (beide Aufnahmen wurden ebenfalls von dieser Präparation gewonnen). Lichtmikroskopisch ist der Zellpuffer als bräunliche erstarrte/kristallisierte Schicht im Hellfeld erkennbar. Die unterschiedliche Autofluoreszenz der Zellen (leuchtend grün) macht diese unter der Matrixschicht (blau) erkennbar. Die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (Abb.5.44 B) zeigt den abgerasterten Bereich der Probe und eine partielle Vergrößerung des Areals. Die Vergrößerung verdeutlicht die effektive laterale Auflösung der Untersuchung, die bei  $\approx 6 \mu\text{m}$   $\varnothing$  liegt. Bei einer voreingestellten Schrittweite des x,y,z-Verfahrensystems von  $9,92 \mu\text{m}$  hätte die Probe lateral höher aufgelöst untersucht werden können. Der rasternd untersuchte Bereich wird nochmals anhand einer lichtmikroskopischen (HF) Aufnahme verdeutlicht (rotes Rechteck, Abb.5.44 C). Die Ergebnisse der rasternden Untersuchung sind in den Abbildungen 5.44 D und E (S.176) dargestellt. Hier wird das *image* des Phosphatidylcholin-Matrix Adduktions ( $[\text{M}+\text{DHB}-\text{H}_2\text{O}]^+$ ;  $m/z$  896,33 Da; rot) über die fluoreszenzmikroskopische bzw. lichtmikroskopische Aufnahme gelegt. Die fluoreszenzmikroskopische Abbildung verdeutlicht, dass die Zellen nach wie vor unter der nicht vollständig desorbierten Zellpufferschicht gut erkennbar sind

(siehe Abb.5.44 D). Dies ist bei Abbildung 5.44 E nicht der Fall. Anhand der Abbildung 5.44 D wird deutlich, dass die Konzentration des  $[M+DHB-H_2O]^+$ -Ions im Bereich der Zellen am höchsten ist und zur Freifläche hin verläuft.

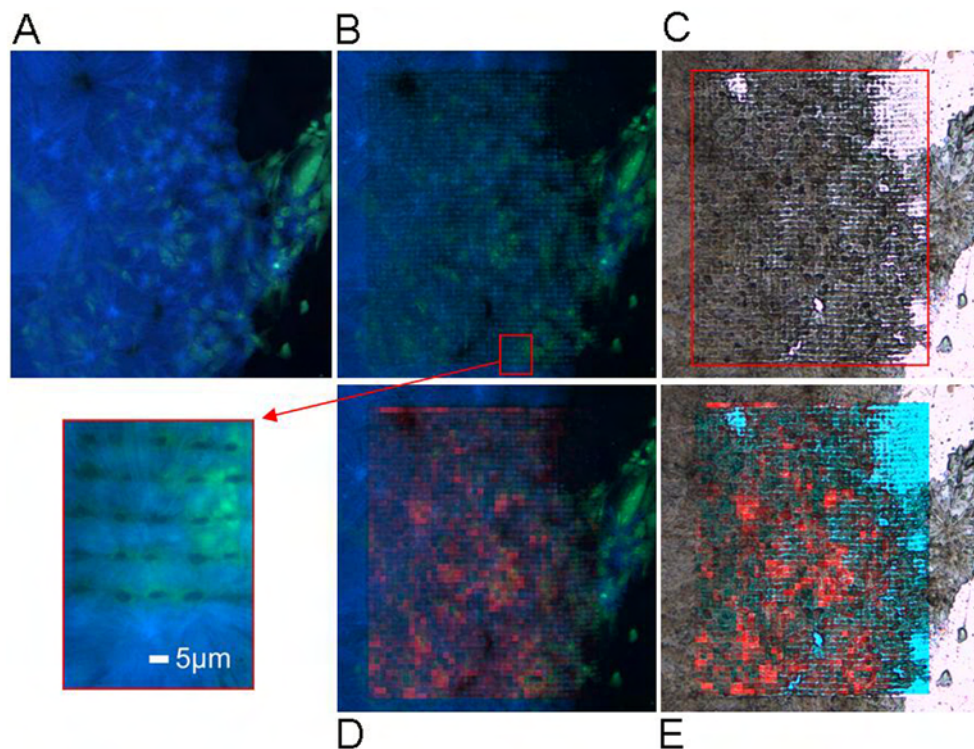


Abbildung 5.44: HeLa Zellen, SMALDI *image* (Multischussspektren, MS<sup>1</sup>, LTQ MS)

Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen sowie das Verteilungsbild einer Zellkomponente von HeLa Zellen präpariert mit Zellpuffer 1. (A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme vor der rasternden Untersuchung (Autofluoreszenz Zellen, grün; Autofluoreszenz 2,5-DHB, blau). (B) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (Probenbereich nach der Rasterung, mit Vergrößerung, effektive laterale Auflösung  $\approx 6 \mu\text{m}$   $\varnothing$ ). (C) Lichtmikroskopische Aufnahme nach der Rasterung (Rasterareal, rotes Rechteck). (D) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme unter dem *image* des  $[M+DHB-H_2O]^+$ -Ions (rot) von Phosphatidylcholin 34:1 ( $m/z$  896,33 Da). (E) Lichtmikroskopische Aufnahme unter dem *image* des  $[M+DHB-H_2O]^+$ -Ions von PC 34:1 (rot). 40×50 Pixel; 9,92  $\mu\text{m}$  Pixelkantenlänge; Multischussspektrum (6 Laserpulse/(Spektrum\*Pixel)); Massenbereich  $m/z$  150-2000 Da.

Um die Ergebnisse der Vorbereitung der Zellen mit weniger Waschschritten zu untersuchen, wurde eine HeLa Zellprobe nach Protokoll 3 vorbereitet. Zusätzlich wurde ein Zellpuffer mit einem höheren Anteil an 2,5-DHB verwendet (ZP2a), um die Kristallisationsneigung des Zellpuffer-Gemisches zu steigern (Abbildung 5.45, S.177). In der lichtmikroskopischen Aufnahme (Abb.5.45 A) wird der rasternd untersuchte Bereich durch ein rotes Rechteck verdeutlicht.

Die Matrix wurde im diesem Bereich vollständig desorbiert. Massive Strukturen in den mikroskopischen Aufnahmen sind Reste der Zellen im untersuchten Probenareal. Nähere lichtmikroskopische Betrachtungen (Daten nicht gezeigt) zeigten, dass die Zellen bei dieser Vorbereitung zwar schrumpfen, aber insgesamt besser erhalten sind. Auf der Basis der rasternden Untersuchung konnte das *image* (rot) des  $[M+DHB-H_2O]^+$ -Ions von Phosphatidylcholin 34:1 erzeugt werden. Die Projektion des *image* über die lichtmikroskopische (Abb.5.45 B) und fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (Abb.5.45 C) zeigen deutlich die maximale Konzentration des  $[M+DHB-H_2O]^+$ -Ions im Bereich der Zellen und dessen leichtes Verlaufen zur zellfreien Fläche hin. Dies wird vor allem bei Abbildung 5.45 C, aufgrund des besseren Bildkontrastes, deutlich. Zusätzlich macht die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme die Zellen, durch deren grüne Autofluoreszenz, besser erkennbar. Außerhalb des abgerasterten Bereiches ist die Matrix (blau) als homogene, kristalline Schicht erkennbar.

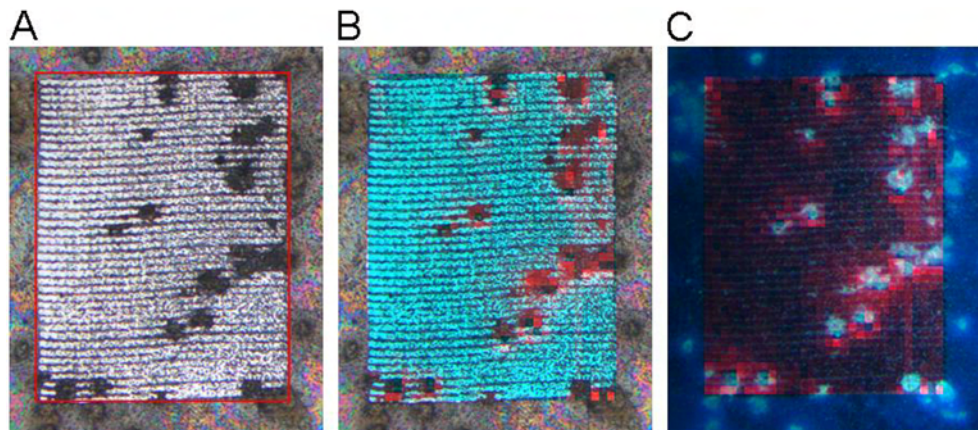


Abbildung 5.45: HeLa Zellen, SMALDI *image* (Multischussspektren, MS<sup>1</sup>, LTQ MS)

Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen sowie das Verteilungsbild einer Zellkomponente von HeLa Zellen präpariert mit Zellpuffer 2a. (A) Lichtmikroskopische Aufnahme (HF nach der rasternden Untersuchung, Rasterareal, rotes Rechteck). (B) Lichtmikroskopische Aufnahme unter dem *image* des  $[M+DHB-H_2O]^+$ -Ions (rot) von Phosphatidylcholin 34:1 ( $m/z$  896,25 Da). (C) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme unter dem *image* des  $[M+DHB-H_2O]^+$ -Ions von PC 34:1 (rot).  $30 \times 40$  Pixel;  $9,30 \mu m$  Pixelkantenlänge; Multischussspektrum (5 Laserpulse/(Spektrum\*Pixel)); Massenbereich  $m/z$  150-2000 Da.

Zwar wurden Zellproben mit Trypsin-Zellpuffer-Mischungen behandelt und anschließend untersucht, es konnten in den daraus erhaltenen Massenspektren jedoch keine eindeutigen Peptidsignale identifiziert werden. Deutlich in den Spektren erkennbar sind allein die Signale der der Membranlipide. Die Erhöhung der Bestrahlungsstärke bei gleichzeitiger Defokussierung (Vergröße-

rung der Desorptions-Laserfokusfläche) ergaben in dieser Hinsicht kein besseres Ergebnis.

#### 5.7.7.2 Gewebeproben

##### 5.7.7.2.1 LTQ MS Untersuchungen

###### MS<sup>1</sup>:

Als erste Gewebeprobe wurde eine nach Protokoll 4 vorbereitete Rattengewebeprobe massenspektrometrisch untersucht (siehe Abb.5.46, S.179). Es handelte sich hierbei um eine Gewebeprobe einer Ratte, die durch den parasitischen Nematoden *Trichinella spiralis* kontaminiert war. Die mikroskopischen Aufnahmen zeigen den abgerasterten Bereich (Abb.5.46 A und B). Der untersuchte Bereich ist in Abbildung 5.46 A (lichtmikroskopisch, HF) zusätzlich durch ein rotes Rechteck hervorgehoben. In der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme (5.46 B) wird die Muskeltrichine, durch ihre hellblau-grünlich Autofluoreszenz, als ovale Struktur sichtbar, während das umgebende Gewebe grün erscheint. Zusätzlich wird neben der abgerasterten Fläche die Matrix (blau) auf dem Gewebe sichtbar. Auch im abgerasterten Bereich sind Reste der Matrix verblieben.

Die Ergebnisse der rasternden Untersuchung sind in Abbildung 5.46 C, durch Projektion der erzeugten *images* (rot, hellblau) über die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme, dargestellt. Die *images* repräsentieren die Verteilung des  $[M+DHB-H_2O]^+$ -Ions (rot;  $m/z$  896,25 Da) von Phosphatidylcholin 34:1 (PC 34:1) und dessen Phosphocholin Kopfgruppe (hellblau;  $m/z$  184,09 Da). Liegen beide Ionen übereinander ergibt sich als Mischfarbe violett. Der größte Teil des untersuchten Bereichs in Abbildung 5.46 C erscheint violett. Bei der Messung wurde demnach im nahezu gesamten untersuchten Bereich, neben dem intakten Matrixadduktion des PC 34:1, ein großer Anteil PC 34:1 fragmentiert. Dieses metastabile Verhalten des PC 34:1 konnte bereits bei der Untersuchung der gedruckten Lipidmuster beobachtet werden. Eine besonders hohe Intensität der Signale beider Ionen ist jedoch innerhalb und angrenzend an die Kapsel des Endoparasiten (*T. spiralis*) zu beobachten. Insgesamt fällt auf, dass die *images* deutlich mit der Verteilung der Matrixreste korrelieren. Die effektive laterale Auflösung lag bei unter  $7\text{ }\mu\text{m}$  Ø.

Auch bei den Gewebeproben wurden tryptische Verdauungen durchgeführt, die jedoch zu keinem eindeutig peptidischen massenspektrometrischen Signal führten. Auch die Vorbereitung von Mäusehirnschnitten, durch Waschen mit stark lipophilen Lösungsmitteln (Toluol, Xylol), führte, hinsichtlich der Unterdrückung von Lipidsignalen und der Beobachtung präformierter Neuropeptide, nicht zum gewünschten Erfolg. Auch die Defokussierung des Laserstrahls ( $\approx 20\text{ }\mu\text{m}$  Ø;  $\approx 130\text{ nJ}$



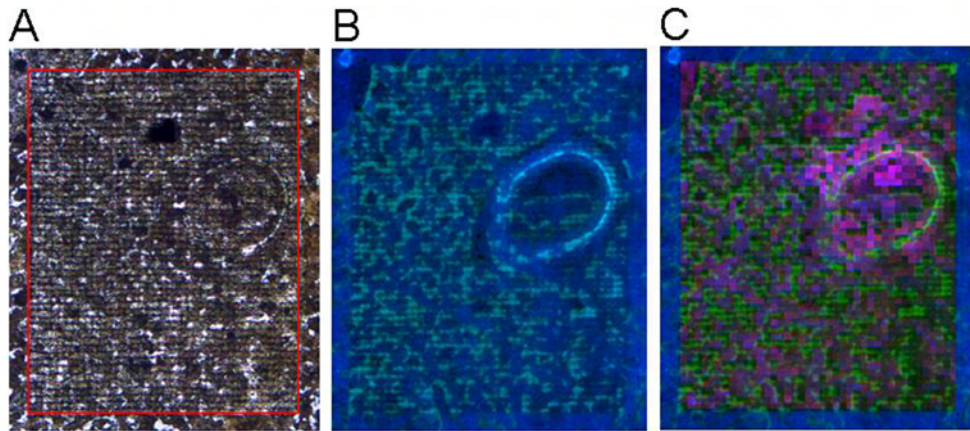


Abbildung 5.46: *Trichinella spiralis* kontaminiertes Rattengewebe, SMALDI *image* (Multischussspektren,  $MS^1$ , LTQ MS)

Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen sowie Verteilungsbilder einer Zellpuffer 2 Präparation von Rattengewebe (Rattenwange; mit *Airspray* nachkristallisiert). (A) Lichtmikroskopische Aufnahme (HF, nach der Rasterung, rotes Rechteck). (B) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (nach der Rasterung). (C) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen unter den *images* des  $[M+DHB-H_2O]^+$ -Ions (rot;  $m/z$  896,25 Da) und der Phosphocholin Kopfgruppe (hellblau;  $m/z$  184,09 Da) von Phosphatidylcholin 34:1 (Mischfarbe violett).  $40 \times 50$  Pixel;  $8,68 \mu m$  Pixelkantenlänge; Multischussspektrum (5 Laserpulse/(Spektrum\*Pixel)); Massenbereich  $m/z$  150-2000 Da.

Laserpulsenergie), zur Vergrößerung der Desorptions-Laserfokusfläche, verlief ergebnislos.

Zur Ermittlung der Mindestkonzentration an Peptid, ab der Peptide massenspektrometrisch in/auf biologischen Proben mit der AP-SMALDI Ionenquelle messbar werden, wurden unterschiedlich konzentrierte interne Standardpeptide (Bradykinin 1-7, *Anti inflammatory peptide*, Bombesin) zu Gewebeschnitten zugesetzt. Das Experiment sollte zusätzlich verdeutlichen:

- Welchen Einfluss die Gewebepreparation hat und
- Welchen Einfluss die Applikationsmethode der Matrix ausübt.

Als Gewebe wurden Mäusegewebeschnitte (Muskelgewebe) verwendet. Die Vorbereitung der Gewebeschnitte sollte dabei das Spektrum unterschiedlicher Gewebepreparationen (schwach bis stark lipophile Lösungsmittel) abdecken. Licht- und fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Präparation wurden bereits dargestellt (siehe Abb.5.43, S.175). In Bezug auf die Matrixverteilung bzw. deren Verteilungsform auf den Schnitten, innerhalb und außerhalb der abgerasterten Areale, ergibt sich aus den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen

folgendes: bei S1 (*Airspray*) zeigt sich außerhalb dieses Bereiches ein sehr starkes, kontinuierliches, innerhalb ein mäßiges Autofluoreszenzsignal von 2,5-DHB (blau), bei S2 (Zellpuffer 2a + 1×*Airspray*) sind nur an einigen Stellen die Autofluoreszenz der Matrix erkennbar, bei Schnitt S3 (*Airspray*) ist außerhalb ein starkes, diskontinuierliches Autofluoreszenzsignal der Matrix erkennbar, bei S4 (Zellpuffer 2a + 1×*Airspray*) ist kein Autofluoreszenzsignal erkennbar.

Welche Auswirkungen ergeben sich durch die Form der Präparation auf Inhalt und Qualität der Massenspektren?

Allgemein kann aus der Betrachtung der Originalspektren festgestellt werden, dass Bombesin und das *Anti inflammatory peptide* verstärkt Alkaliionen bilden (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich lässt sich eine etwa gleich niedrige Signalintensität dieser beiden Peptide feststellen, obwohl Bombesin höher konzentriert zugesetzt wurde.

Betrachtet man die Signalintensitäten der unterschiedlichen Gewebeschnitte im Vergleich, lassen sich folgende Aussagen treffen:

- Bei S2 war insgesamt die stärkste Signalintensität aller  $[M+H]^+$ -Ionen feststellbar.
- Der S4 Schnitt zeigt einen vergleichsweise höheren Signalhintergrund, ist aber beim Absolutsignal von Bradykinin 1-7 höher als Schnitt S3 und damit vergleichbar mit S1.
- Die Reihenfolge der beobachteten Signalintensitäten ist:  $S2 > S1 = S4 \gg S3$ .

Zusätzlich muss jedoch festgestellt werden, dass eine zweifelsfreie Identifikation der Peptide Bombesin und *Anti inflammatory peptide*, hätte es sich um unbekannte Peptide gehandelt, bei allen Schnitten nicht über Einzelspektren, auch bei aufgeweitetem Desorptions-Laserfokusdurchmesser, möglich gewesen wäre. Lediglich in den Spektren von S2 waren die beiden niedriger konzentrierten Peptide, bei hoher lateraler Auflösung, durch Summierung von 15-20 Spektren deutlich erkennbar. Die in Abbildung 5.47 (S.182) dargestellten *images* sollten deshalb vor allem in Bezug auf die Verteilung von Bradykinin 1-7 interpretiert werden, da hier sogar bei S3 ein völlig eindeutiges Massensignal vorlag. Zieht man die Signalintensität der Lipidsignale mit in Betracht, so zeigt S4, aber vor allem S3, deutliche Lipidsignale. Bei den Schnitten S1 und S2 ist das Lipidsignal am stärksten supprimiert. Die Schnitte S1 und S2 wurden mit Aceton + 10 % Eisessig (stark lipophil) vorbereitet.

Auf der Basis der rasternden Untersuchung wurden massenspektrometrische Verteilungsbilder der  $[M+H]^+$ -Ionen aller zugesetzten Peptide erzeugt. Die *images* sollen einerseits die Verteilung der Peptide selbst, aber auch ihre Verteilung in Relation zum Signal des Phosphatidylcholin 34:1 ( $[M+DHB-H_2O]^+$ -Ion) verdeutlichen. Die rasternde Untersuchung des zweiten Dünnschnittes (S2) erfolgte aufgrund messtechnischer Probleme auf einem kleineren Areal. Dennoch genügte die Arealgröße, um eine Verteilung zeigen zu können. Es soll nochmals erwähnt werden, dass die Zugabe der Peptide als wässrige Lösung erfolgte. Ein Migration endogener Komponenten der Schnitte ist deshalb nicht ausgeschlossen. Zusätzlich zu den *images* wurden die absoluten Signalintensitäten von Bradykinin 1-7 und Bombesin aus Summenspektren ermittelt und zur Desorptionsfläche in Beziehung gesetzt. Ergänzend wurde die Analytmenge von Bradykinin 1-7, die absolut pro Desorptionsort verbraucht wurde, interpoliert.

Die drei Verteilungsbilder vom ersten Dünnschnitt des Mäusemuskelgewebes (siehe Abb.5.47 S1) zeigen sowohl eine verstreute Verteilung der Peptidsignale als auch des PC 34:1 Signals. Betrachtet man zunächst die Verteilungen der  $[M+H]^+$ -Ionen von Bradykinin 1-7 und von Bombesin genauer, so zeigen beide eine zerstreute Verteilung mit einem höheren Aufkommen in den oberen 2/3 des untersuchten Bereichs. Bradykinin und Bombesin treten dabei zumeist getrennt auf. Die geschätzte Überlappung beider Verteilungen beträgt  $\approx 30\%$ . Anders bei der Überlappung der Verteilung des  $[M+H]^+$ -Ions von Bradykinin 1-7 und des  $[M+H]^+$ -Ions des *Anti inflammatory peptide*. Beide treten häufig zusammen auf (Überlappung  $\approx 60\%$ ). Vergleicht man die Verteilung des  $[M+H]^+$ -Ions von Bradykinin 1-7 und des  $[M+DHB-H_2O]^+$ -Ions von Phosphatidylcholin 34:1, so überlappen beide zu etwa  $50\%$ .

Für den weiteren mittels *Airspray* präparierten Dünnschnitt S3 (siehe Abb. 5.47 S3) sind zwei Abweichungen zu den Ergebnissen von S1 erkennbar. Zum einen tritt das  $[M+H]^+$ -Ion des Bradykinin kaum zusammen mit dem *Anti inflammatory peptide* oder Bombesin auf. Die Überlappung liegt im Falle von Bombesin bei  $\approx 20\%$ , beim *Anti inflammatory peptide* bei  $\approx 30\%$ . Zum anderen ist das Signal des PC 34:1  $[M+DHB-H_2O]^+$ -Ions abundanter als beim S1. Es überlappt mit dem Bradykinin 1-7 Signal weniger als bei S1 ( $\approx 30\text{--}40\%$ ) und findet sich auch teilweise in den Rissen, die durch die Vorbereitung in der Probe entstanden sind. In diesen Rissen sind auch teilweise Ionensignale der Peptide messbar. Die Verteilung aller gemessenen Komponenten ist dennoch nahezu homogen.

Betrachtet man die Verteilungsbilder des kleineren Rasterareals von S2 (siehe Abb.5.47 S2), so fällt hier eine Diagonalverteilung auf, die durch eine massive

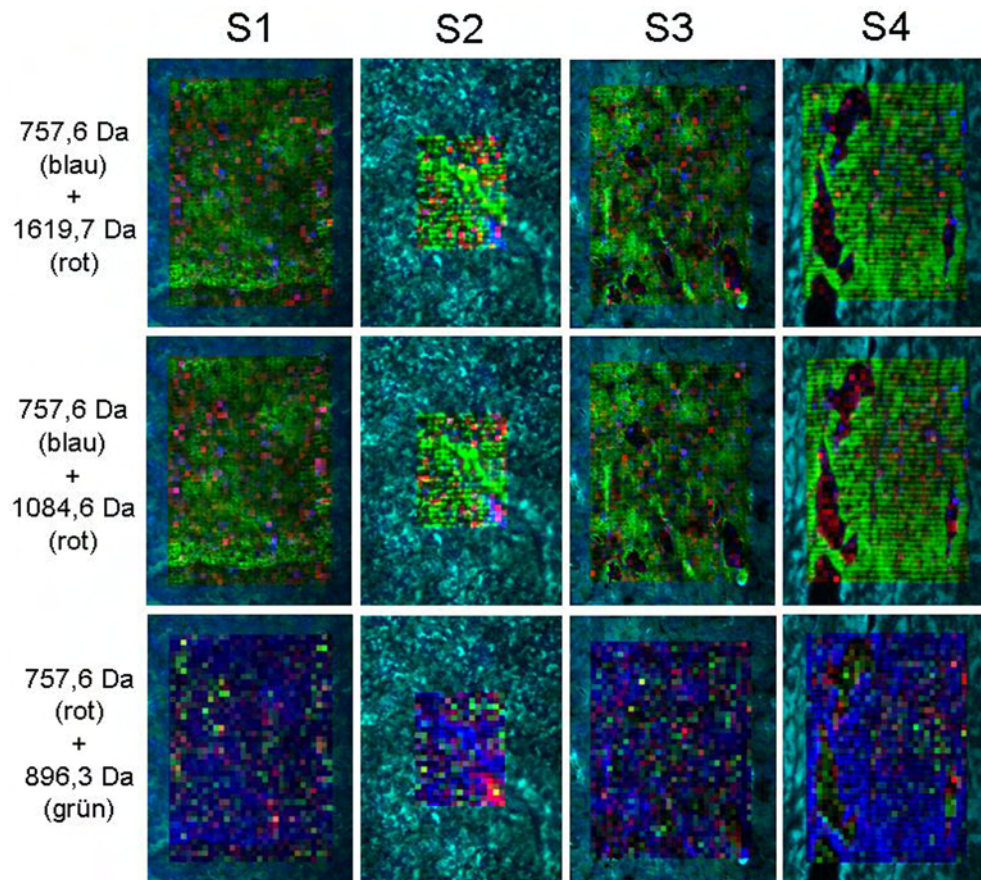


Abbildung 5.47: Interner Peptidstandard bei Rattengewebe, Vergleich der SMALDI *images* bei unterschiedlicher Vorbereitung und Präparation (Multischussspektren, MS<sup>1</sup>, LTQ MS)

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen und Verteilungsbilder von vier Mäusegewebeschnitten (S1-S4). (obere Reihe) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen unter *images* von Bradykinin 1-7 ( $[M+H]^+$ ;  $m/z$  757,6 Da; blau) und Bombesin ( $[M+H]^+$ ;  $m/z$  1619,7 Da; rot). (mittlere Reihe) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen unter *images* von Bradykinin 1-7 ( $[M+H]^+$ ; blau) und *Anti inflammatory peptide* ( $[M+H]^+$ ;  $m/z$  1084,6 Da; rot). (untere Reihe) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen unter den *images* von Bradykinin 1-7 ( $[M+H]^+$ ; rot) und dem Matrixadduktion von Phosphatidylcholin 34:1 ( $[M+DHB-H_2O]^+$ ;  $m/z$  896,3 Da; grün). S1, S3, S4: 30×40 Pixel; S2: 15×20 Pixel; 9,30  $\mu$ m Pixelkantenlänge; Multischussspektren (5 Laserpulse/(Spektrum\*Pixel)).

Struktur des Gewebes verursacht wird. Auch hier ist die Überlappung in der Verteilung der gemessenen Komponenten unterschiedlich. Bradykinin 1-7 und Bombesin überlappen mit  $\approx 30\%$  weniger stark als Bradykinin 1-7 und das *Anti inflammatory peptide* ( $\approx 50\%$ ). Die Überlappung von Bradykinin 1-7 und dem Matrixadduktion des PC 34:1 ist ebenfalls durch die Gewebestruktur geprägt. Beide Ionen zeigen eine Überlappung von  $\approx 50\%$ , aber auch deutlich getrennte



Areale rechts oben und unten.

Bei Betrachtung der Verteilungsbilder des Schnittes 4 (S4, siehe Abb.5.47 S4) fällt zunächst die Inhomogenität der Signalverteilung auf. Massensignale sind auf der Gewebefläche zu finden, ihre Abundanz ist aber in den durch die Gewebevorbereitung erzeugten Geweberissen höher. Dies trifft auch stark für das PC 34:1 Matrixadduktion, als endogenen Bestandteil, zu. Die Vorbereitung, Peptidapplikation und Präparation führten also zu einer Migration des PC 34:1. Die Peptidverteilung zeigt, dass bei diesem Dünnschnitt das Bradykinin besonders selten zusammen mit Bombesin vorkommt. Die Überlappung beträgt lediglich  $\approx 10\%$ . Im Gegensatz dazu treten Bradykinin und das *Anti inflammatory peptide* mit  $\approx 50\%$  zusammen auf.

Bei allen Dünnschnitten korreliert die Verteilung der Komponenten mit den Probenbereichen, von denen stark desorbiert wurde. Umgekehrt bedeutet eine starke Desorption nicht automatisch auch eine hohe Signalintensität, sie scheint aber als Grundvoraussetzung dafür notwendig. Dies gilt für die Bereiche, wo sich Gewebe befindet, nicht unbedingt für die Risse. Die unterschiedliche Vorbereitung und Präparation der Schnitte S3 und S4 erlaubt zwar keinen direkten Vergleich, bei Betrachtung aller Schnitte, und mit Hilfe der Massenspektren, wird jedoch ein indirekter Vergleich möglich. So führt die Auftragung des Zellpuffers mit der Pipette zwar zu qualitativ besseren Massenspektren, aber auch zu einer partiellen Verdriftung des Analyten. Diese trat bei der *Airspray* Präparation nicht auf und kann, falls aufgetreten, vermutlich der wässrigen Auftragung der Peptide zugeschrieben werden. Die weitestgehende Entfernung der Lipide ist wichtig, um ein höheres Peptidsignal zu bekommen. Chloroform scheint hierbei ungeeignet. Ethanol führt zu einer partiellen Entfernung. Am vollständigsten entfernte Aceton + 10 % Eisessig die Lipidsignale. Dies wird durch die in Tabelle 5.7 (S.184) dargestellten Ergebnisse verdeutlicht.

Die Ergebnisse, die in Tabelle 5.7 (S.184) dargestellt sind, zeigen tendentiell eine höhere Signalintensität der Peptide bei den mit Zellpuffer präparierten Schnitten (S2 und S4). Hier wiederum zeigt, der mit Aceton + 10 % Eisessig vorbereitete Schnitt S2, die mit Abstand höchste Signalintensität. S1 und S3 wurden mit *Airspray* präpariert. S1 wurde mit Aceton + 10 % Eisessig vorbereitet und zeigt eine höhere Peptidsignalintensität als der mit Chloroform vorbereitete Schnitt S3. Bei weiteren Muskelgewebeschnitten von Mäusen, die durch Chloroform und Xylol vorbereitet wurden, ist in den Massenspektren eine selektive Entfernung z.B. des PC 34:1 Massensignals zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Diese selektive Entfernung des PC 34:1 Signals ist bei der

Messung von S3 nicht festzustellen.

Die höchste Signalintensität im Verhältnis zur verbrauchten Analytmenge zeigt die Zellpufferpräparation S2. Die Signalintensität des  $[M+DHB-H_2O]^+$ -Ions von PC 34:1 ist nicht eindeutig im Hinblick auf das verwendete Vorbereitungsverfahren von S1 und S2. Beide Schnitte wurden identisch vorbereitet, dennoch ist die PC 34:1 Intensität beim Schnitt S2 am niedrigsten und beim Schnitt S1 am höchsten. Die Schnitte S3 und S4 sind bei der Signalintensität des PC 34:1 Matrixadduktions etwa gleich.

Des Weiteren zeigen die Ergebnisse eindeutig, dass eine Vergrößerung der Desorptionsfläche zu einer Erhöhung der Signalintensität führt. Dabei verhält sich der Zuwachs an Signalintensität jedoch unterschiedlich zur Vervielfachung der Desorptionsfläche. Die Bestimmung der Desorptionsfläche ist, aufgrund der stark asymmetrischen Form größerer Brennflecken, mit einem geschätzten Messfehler von 10-20 % behaftet.

Tabelle 5.7: VERGLEICH SIGNALINTENSITÄT UND DESORPTIONSFLÄCHE

Überblick über die Signalintensitäten von zwei der drei zugesetzten Peptide (Bradykinin 1-7, *Anti inflammatory peptide*) zu Mäusemuskulgewebe (Dünnschnitte) und dem endogenen  $[M+DHB-H_2O]^+$ -Ion von PC 34:1. Die Signalintensitäten werden zur Vergleichbarkeit zusammen mit der Desorptionsfläche aufgeführt. Die Signalintensität wird als absoluter Detektorwert, summiert über alle Spektren, angegeben. Peptidkonzentration (wässrige Lösung): Bradykinin 1-7,  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/L; Bombesin,  $4 \cdot 10^{-6}$  mol/L). Eine Vergrößerung der Desorptionsfläche wurde durch Defokussierung erzielt.

	S1	S2	S3	S4
Bradykinin 1-7 $[M+H]^+$ ( <b>kleiner</b> Laserfokus)	0,73	1,76	0,24	0,77
Bombesin $[M+H]^+$ ( <b>kleiner</b> Laserfokus)	0,169	0,100	0,097	0,162
Phosphatidylcholin 34:1 $[M+DHB-H_2O]^+$ ( <b>kleiner</b> Laserfokus)	0,30	0,18	0,24	0,27
Desorptionsfläche auf der Probe [ $\mu m^2$ ]	22,0	34,5	40,0	25,9
Berechnete Probenmenge [ $10^{-18}$ mol/Pixel] (Bradykinin 1-7)	<b>45</b>	<b>71</b>	<b>82</b>	<b>53</b>
Signalintensität Bradykinin 1-7 $[M+H]^+$ ( <b>großer</b> Laserfokus)	1,4	3,04	0,68	2,28
Desorptionsfläche auf der Probe ( $[\mu m^2]$ )	130,9	226,1	251,0	121,0
Berechnete Probenmenge [ $10^{-18}$ mol/Pixel] (Bradykinin 1-7)	<b>267</b>	<b>461</b>	<b>512</b>	<b>247</b>
Vervielfachung Desorptionsfläche	5,9	6,5	6,3	4,7
Vervielfachung Signalintensität (Bradykinin 1-7, $[M+H]^+$ )	2	1,7	2,8	3

**MS<sup>2</sup>:**

Auch MS<sup>2</sup> Messungen wurden an biologischen Proben mit niedriger Kollisionsenergie an der Masse  $m/z$  760,00 Da (Isolationsweite:  $\pm 1,25$  Da) und 896,00 (Isolationsweite:  $\pm 0,8$  Da) durchgeführt. Diese hier nicht gezeigten Untersuchungen zeigten ein Fragmentierungsmuster, wie es bei den MS<sup>2</sup> Messungen des PC 34:1 als Reinsubstanz auftrat. Damit konnten die beiden fragmentierten Massensignale als PC 34:1 identifiziert werden.

**5.7.8 Ergebniszusammenfassung – biologische Proben**

Die Messungen an den biologischen Zell- und Gewebeproben erfolgten nahezu ausschließlich mit dem LTQ MS. Bei den biologischen Zellproben konnte die Verteilung des Zellmembranbestandteils Phosphatidylcholin 34:1 (PC 34:1), durch mehrere massenspektrometrische Verteilungsbilder, dargestellt werden. In den Massenspektren sind Signale weiterer lipidischer Membranbestandteile erkennbar, die jedoch nicht bildgebend verarbeitet wurden. Bei den biologischen Gewebeproben konnten ebenfalls *images* für PC 34:1 erzeugt werden. Auch hier sind in den Spektren Signale weiterer Membranlipide vertreten, die jedoch auch hier nicht bildgebend charakterisiert wurden. Präpariert wurde dabei ausschließlich mit unterschiedlichen Zellpuffern, die ggfs. nachkristallisiert wurden. Zellpuffer 1 erwies sich dabei zur Präparation von Zellproben, die Zellpuffer 2 und 2a für Gewebe als besonders geeignet. Die Membranbestandteile erscheinen in den Spektren vornehmlich in der Form ihrer Matrixadduktionen. Verdauexperimente mit Trypsin wurden sowohl bei den Zell- als auch den Gewebeproben durchgeführt, führten jedoch zu keinen Massenspektren mit eindeutigen Peptidsignalen. Vereinzelte Spektren deuteten auf Peptide hin, jedoch scheint deren Konzentration insgesamt bei Zell- und Gewebeproben bisher zu niedrig, um mit der verwendeten Konfiguration der AP-SMALDI Ionenquelle nachgewiesen werden zu können. Diese Aussage wird durch die experimentelle Überprüfung mittels interner Standardpeptide bei Gewebeproben bestätigt (s.u.). Demzufolge konnten keine Ergebnisse aus rasternden Untersuchungen mittels FT MS von Zell- oder Gewebeproben, bei einer effektiven lateralen Auflösung  $< 9 \mu\text{m}$  im Standardbetrieb, gewonnen werden. Lediglich bei FT MS Untersuchungen an Gewebeschnitten, mit linearer Bewegung des x,y,z-Probenverfahrtisches und vor Einbau der FT-ICR Ultra Zelle, konnte das  $[M]^+$ -Ion des PC 34:1 im SIM Modus gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Durch Aufweitung des Laserstrahls konnte eine Erhöhung der Messsignale in den Massenspektren erzielt werden. Die Erhöhung verläuft jedoch niedriger als das Maß der Aufweitung

und führte zu keiner ausreichenden Signalerhöhung im verwendeten Aufbau.

Im Hinblick auf die Vorbereitung der Zellproben ergaben sich klare Hinweise darauf, wie diese durchgeführt werden sollte. Dabei muss, bedingt durch die Empfindlichkeit zellulärer Strukturen, die analytische Fragestellung klar definiert sein. Bei Verwendung von Waschmethoden, die stark lipophile organische Lösungsmittel verwenden, werden zwar die Membranlipide entfernt und somit die Detektion von massenspektrometrischen Peptidsignalen gefördert, gleichzeitig wird jedoch die Zelle als Ganzes und somit ihre räumliche Ordnung zerstört. Die Probenvorbereitung sollte deshalb mit wässrigen bis schwach alkoholischen, schwach osmotischen oder isotonischen Lösungen erfolgen. Somit ist aber in erster Linie nur eine Vorbereitung zur Untersuchung der Lipidbestandteile der Zelle möglich. Die Gewebeproben wurden mit stärker lipophilen Lösungsmitteln als die Zellproben vorbereitet, da diese weniger empfindlich als Zellen reagieren. Dabei wurde aus den Massenspektren ersichtlich, dass die Verwendung von Aceton + 10 % Eisessig in den meisten Fällen zu einer Reduktion von Lipidsignalen führte. Dahingegen zeigen Xylol und Chloroform eine selektive Beseitigung von Membranlipiden (Verlust des PC 34:1 Signals), während andere Massensignale (z.B. Phosphatidylserin 32:1) erhalten bleiben (Daten nicht gezeigt).

Die Applikation von Standardpeptiden, als interner Standard auf Gewebeschnitten, gab Aufschluss darüber, warum endogene peptidische Signale nach Verdauexperimenten ausblieben. Dazu wurden Mausgewebedünnschnitte (Muskelgewebe) unterschiedlich vorbereitet und präpariert. Insgesamt wurden  $4,5 \cdot 10^{-11}$  mol Peptid pro Dünnschnitt appliziert. Die Präparation erfolgte mit entweder mit Zellpuffer 2a (Nachkristallisation mit *Airspray*) oder ausschließlich *Airspray*. Nur das am höchsten konzentrierte Peptid (Bradykinin 1-7,  $1 \cdot 10^{-5}$  mol/L) konnte dabei als deutliches Signal in allen erzeugten Massenspektren gemessen werden, unabhängig davon, ob die Präparation mit Zellpuffer oder *Airspray* erfolgte. Die Messungen wurden alle mit der neuen AP-SMALDI Ionenquelle am LTQ MS durchgeführt. Ausschließlich die Originalspektren des Dünnschnittes S2 zeigten ein deutlich erkennbares Signal der niedriger konzentrierten Peptide (Bombesin,  $4 \cdot 10^{-6}$  mol/L; *Anti inflammatory peptide*,  $1 \cdot 10^{-6}$  mol/L) bei Summierung von weniger als 10 Spektren. Schnitt S2 wurde mit Aceton + 10 % Eisessig vorbereitet und mit Zellpuffer 2a und einmaligem Nachbesprühen präpariert.

Die Auftragung der internen Standardpeptide als wässrige Lösung und mittels Pipette konnte klar die Grenzen der analytischen Möglichkeiten der verwen-

deten AP-SMALDI Konfiguration aufzeigen. Zudem wurde deutlich, dass vor allem die verwendete Auftragsvariante zu Analytmigration präformierter Peptide führen kann. Die Migration dieser präformierten Peptide wurde durch die Applikation des wässrigen Zellpuffers verstärkt. Dennoch sind einige Aussagen hinsichtlich der Vorbereitung und Präparation aus den Ergebnissen formulierbar. Die rasternden Untersuchungen zeigten, dass eine Vorbereitung durch Waschung mit Aceton + 10 % Eisessig und Zellpuffer 2a Präparation nicht nur die höchsten Signalintensitäten der internen Standardpeptide ergibt, sondern auch, wie bereits erwähnt, zur höchsten Suppression des PC 34:1 Ionensignals führt. Obwohl Dünnschnitt S1 ebenfalls mit Aceton + 10 % Eisessig vorbereitet wurde, kann die Lipidsignalsuppression hier nicht in dem Maße festgestellt werden. Schnitt S1 wurde im Unterschied zu S2 ausschließlich mit *Airspray* präpariert. Im Umkehrschluss ergibt sich dennoch, trotz dieses uneinheitlichen Ergebnisses, dass bei Geweben, zur Untersuchung der Lipidverteilung, von der Benutzung stark lipophiler organischer Lösungsmittel abgesehen werden sollte.

Die effektive laterale Auflösung der Gewebeuntersuchungen mit internen Standardpeptiden liegt, außer bei gezielter Defokussierung, bei  $<8\ \mu\text{m}$  Ø. Die pro Pixel verbrauchte Analytmenge wurde damit auf  $40\text{--}80 \cdot 10^{-18}$  mol für Bradykinin 1-7 berechnet. Bei Erhöhung der Desorptions-Laserfokusfläche durch Defokussierung beträgt die pro Pixel verbrauchte Analytmenge  $200\text{--}800 \cdot 10^{-18}$  mol. Daraus ergibt sich für die Untersuchung biologischer Proben, unter den hier herrschenden Bedingungen: bei optimaler Vorbereitung, also weitestgehender Entfernung interferierender Bestandteile, müssen beim verwendeten AP-SMALDI Aufbau, für Untersuchungen mit hoher lateraler Auflösung, mindestens  $50 \cdot 10^{-18}$  mol Analytsubstanz pro Desorptionsort für einen eindeutigen Nachweis vorhanden sein. Dies gilt für eine Untersuchung mittels Multischusspektren und einer fast vollständigen Desorption des Probenmaterials. Dabei sind Wechselwirkungen durch Signalsuppression der Analyten untereinander, wie sie bei Zunahme der Signalvielfalt zu erwarten sind, nicht berücksichtigt.

Im Hinblick auf die Identifikation unbekannter Massensignale in den Spektren kann hinzugefügt werden, dass im Falle der möglichen Summierung über  $\approx 10$  aufeinander folgende Spektren/Desorptionsorte, eine um das 3-5-fach niedrigere Konzentration zur Identifikation ausreichend wäre. Diese Sensitivitätsangaben gelten, um dies nochmal zu verdeutlichen, für rasternde Untersuchungen mit dem LTQ MS und der Probenvorbereitung mit lipophilen Lösungsmitteln (z.B. Aceton + 10 % Eisessig). Dabei müssen jedoch die bereits beschriebe-

nen Konsequenzen für die Struktur biologischer Proben einkalkuliert werden. Wichtig ist also, wie bereits erwähnt, die Ausrichtung an der analytischen Fragestellung.

## 5.8 Diskussion der Ergebnisse – Zellpuffer, artifizielle Proben, Zell- und Gewebeprevorbereitung, SMALDI-Präparation und -Untersuchung

**Zellpuffer:** Zunächst sollen die veränderten Kristallisations- und Lösungseigenschaften des Zellpuffers, im Vergleich zu herkömmlichen 2,5-DHB Matrixlösungen diskutiert werden. Der Ansatz, Zucker oder Zuckerderivate als Additiv zu wässrigen Matrixlösungen hinzuzusetzen, wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen verfolgt (Castoro und Wilkins, 1993; Glückmann und Karas, 1999). Auch dort trugen sie zu erhöhter Homogenität der Präparation bei. Beim Zellpuffer äußert sich dies in Form einer homogenen Erstarrung bzw. feinen Kristallisation. Auch Lemaire et al. (2006) konnten zeigen, dass Zusätze zu gewöhnlichen MALDI Matrices deren Kristallisationseigenschaften positiv verändern und zu besseren Spektren und erhöhter Sensitivität führen. Diese positive Veränderung der Eigenschaften gelang jedoch nur bei Matrixgemischen, die später auch tatsächlich auskristallisierten (Armstrong et al., 2001; Lemaire et al., 2006). Blieben die Matrices flüssig, so wurden gar keine Spektren oder nur Spektren von mangelhafter Qualität erzielt. Ergänzend zur Änderung der Kristallisationseigenschaften der Matrix, wurde eine Erhöhung der Löslichkeit von Proteinen beschrieben (Ogorzalek-Loo und Loo, 2007). Dies Löslichkeitserhöhung könnte zu einer Verbesserung der Co-Kristallisation führen (Bouschen, 2004). Die homogenere Kristallisation und die Erhöhung der Löslichkeit würden somit die höhere Signalintensität in Spektren der Zellpuffer Präparationen erklären (siehe Kapitel 5.7.1.5, S.152). Ein herausragender Vorteil der Zellpuffer Präparationen, im Vergleich zu Standard 2,5-DHB *dried droplet* Präparationen, ist dabei die homogen hohe Signalintensität von allen Bereichen der Präparationsfläche. Bei Standard 2,5-DHB *dried droplet* Präparationen erhält man hohe Signale lediglich aus dem Randbereich der Präparation (*sweet spots*), wobei auch hier Schwankungen durch mangelnde Co-Kristallisation auftreten (Bouschen, 2004).

Das o.g. Phänomen schlechter Spektren, bei Verbleib der Matrix in flüssigem/gelartigem Zustand, wird durch die eigenen Untersuchungen bestätigt. Die Kristallisation scheint eine obligate Vorbedingung zur Erzeugung qualitativ hochwertiger Massenspektren bzw. von Massenspektren überhaupt zu sein,

wenn man nicht die Bestrahlungsstärke erhöhen will (Armstrong et al., 2001). Eine Erklärung dieses Phänomens könnte die resultierende mangelnde Ablation von Probenmaterial sein, da eine in der Probe stattfindende Explosion (*phase transition explosion*) in einem Gel, durch ein mangelndes mechanisches Widerlager, nicht zur gewünschten Ablation führt. Die Explosion verpufft also förmlich im Gel. In Bereichen mit niedrigerer Probenschichtdicke (Randbereich der Präparation) ist durch die Oberfläche des Probenträgers ein Widerlager für die Explosion bzw. eine photomechanische Schockwelle gegeben. Eigene Messungen ergaben, dass aus diesem Bereich, selbst bei gelartigem Zustand der Präparation, Spektren gemessen werden konnten. Ähnliche Beobachtungen in Bezug auf gelartige Proben konnten von Turney und Harrison (2004) gemacht werden.

Die Massenspektren des Zellpuffers zeigen zusätzliche Ionensignale von Additivaddukten im unteren Massenbereich bis  $m/z$  300 Da. Matrix-Clusterionen können bis  $\approx 1000$  Da festgestellt werden (siehe Kapitel 5.7.1.3, S.150). Dies konnte zusammen mit einer Tendenz des Analyten zur Matrixadduktbildung beobachtet werden ( $[\text{DHB-H}_2\text{O}]^+$ -Ion, siehe Kapitel 5.7.1.4, S.151). Dies ist jedoch auch bei Standard 2,5-DHB Präparationen ein generelles Problem unter Verwendung von Atmosphärendruck-Ionenquellen (Laiko et al., 2000b; O'Connor und Costello, 2001; Doroshenko et al., 2002; Loboda und Chernushevich, 2005). In Bezug auf die  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ -Ionen der Peptide und Lipide besitzt der Zellpuffer Vorteile zu anderen flüssigen Matrixgemischen (Li et al., 2005), da Alkaliionen teilweise, evtl. durch D(-)Mannitol, gebunden werden. Zusätzlich ist, im Gegensatz zur Fraktionierung bei Standard 2,5-DHB Präparationen, wie sie von Bouschen und Spengler (2007) beschrieben wird, keine getrennte Verteilung der  $[\text{M}+\text{H}]^+$ - und  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ -Ionen zu beobachten (s.u.). Allerdings lag die laterale Auflösung bei der zitierten Veröffentlichung  $<1 \mu\text{m}$ .

Eine wichtige Frage für die Durchführung weiterer Versuche unter Verwendung der Zellpuffer ist, ihre Eignung als Milieu in dem die Aktivität von Trypsin weitestgehend erhalten bleibt. Bei bisher verwendeten flüssigen, ionischen Matrices sollte diese Bedingung nicht erfüllt sein, da diese einen hohen Anteil denaturierender, organischer Lösungsmittel aufweisen (Armstrong et al., 2001; Turney und Harrison, 2004; Cramer und Corless, 2005; Li et al., 2005). Im Zellpuffer werden ausschließlich Bestandteile verwendet, die die Funktion von Trypsin nicht erheblich beeinflussen sollten und es ist eine rein wässrige Lösung. Dennoch könnte das Ausbleiben tryptischer Spaltprodukte, wie es im Rahmen dieser Arbeit bei den Untersuchungen an biologischen Proben beobach-

tet wurde, mindestens zwei Gründe haben: 1) Trotz kontrollierter Bedingungen schränkt eine Komponente oder ein Faktor im Zellpuffer die Effektivität des Trypsins ein oder 2) das Trypsin arbeitet, jedoch ist die Konzentration der Spaltprodukte zu niedrig, um sie massenspektrometrisch nachweisen zu können.

Zunächst also die Frage des Einflusses der Faktoren und Komponenten im Zellpuffer. Tris sollte als Komponente im Zellpuffer unbedenklich sein, da es ohnehin im Standardpuffer für den tryptischen Verdau enthalten ist (Roche Diagnostics GmbH, 2009). D(-)-Mannitol ist als *compatible solute* als völlig unbedenklich einzustufen, jedoch zeigt es wohl Affinität zu Alkaliionen. Für eine erhöhte Affinität zu Erdalkaliionen konnten keine Evidenzen gefunden werden. Diese mögliche Affinität ist also nicht geklärt. Dieser Gesichtspunkt ist für die Funktion des Trypsins nicht unerheblich, denn gerade Calcium führt zu dessen Stabilisierung und Aktivitätserhöhung bei niedrigen pH-Werten (Sipos und Merkel, 1970). Zudem wird der Zellpuffer mit Ionenaustauscher behandelt. Der verwendete Dowex 50W-8 Austauscher besitzt eine Affinität sowohl zu Alkali- als auch zu Erdalkaliionen. Eine Entfernung von Calcium aus der Lösung ist also wahrscheinlich (Cliffe und David A. W. Grant, 1981). Ein weiterer Gesichtspunkt im Hinblick auf die Trypsinaktivität, ist die intermediäre Absenkung des Gehaltes an freiem Wasser. Für Trypsin wird für die Absenkung des Gehalts an freiem Wasser, und bei gleichzeitig sinkendem pH-Wert, eine Erhöhung der Aktivität beschrieben (Fadnavis et al., 1998). Jedoch wurde bei dieser Erhebung zusätzlich Calcium zugesetzt. Der vorherrschende pH-Wert im Zellpuffer sollte also zu einer Senkung der Trypsin Aktivität, aber nicht zu ihrem vollkommenen Verschwinden führen. Zusätzlich spielt der variierende Gehalt an freiem Wasser eine Rolle. Auch könnte der Zusatz von Calcium zum Zellpuffer, nach der Ionenaustausch-Prozedur, eine stabilisierende Option darstellen. Insgesamt könnten Experimente, zur genaueren Betrachtung des pH-Wertes, zusätzlichen Aufschluss geben. Ein experimentelles Design könnte die schrittweise Erhöhung des pH-Wertes der Lösung, bei gleichzeitiger Kontrolle der Spaltaktivität des Trypsins (Signalintensität der Edukt/Produkt-Signale im MS), vorsehen. Alternativ könnten andere organische Puffersubstanzen wie z.B. MES (2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure) verwendet und getestet werden. Ein weiterer Aspekt, der die Aktivität des Trypsins herabsetzen könnte, ist die Erhöhung der Viskosität des Zellpuffers (siehe Abb.5.23, S.146). Mit zunehmender Viskosität sinkt die Wahrscheinlichkeit der Migration entstehender Spaltprodukte, jedoch sinkt auch die Wahrscheinlichkeit des Zusammentreffens zwischen Enzym und Substrat durch Senkung der Molekülmobilität.



Insgesamt konnte gezeigt werden, dass der Zellpuffer, bei der Präparation artifizieller Oberflächen (z.B. geätzte Silizium Strukturen), neue Möglichkeiten eröffnet (siehe Abb.5.30, S.157). Darüber hinaus bildet dieser, auch für die Präparation biologischer Oberflächen, eine universelle Matrixmischung (siehe Abb.5.24, S.147 und Abb.5.25, S.147). Die Spektrenqualität und Intensität von peptidischen Analyten ist, im Vergleich zu Standard MALDI 2,5-DHB Präparationen, deutlich erhöht (siehe Tab.5.6, S.153) und zudem im gesamten Präparationsbereich gegeben. Die Kristallisationseigenschaften des 2,5-DHB im Zellpuffer (homogene Erstarrung bzw. feinkristalline Kristallisation) ermöglichen eine höchst authentische Präparation auch feiner biologischer Strukturen. Die Auftragung der Zellpuffer bzw. Zellpuffer-Trypsin Mischungen auf biologische Proben könnte jedoch durchaus verbessert werden. Hier könnte die Auftragung mittels Ultraschall-Verneblung einen deutlich Vorteil im Vergleich zur Auftragung mittels Mikromanipulator oder Kolbenhubpipette bieten. Erste Experimente in diese Richtung lieferten vielversprechende Ergebnisse. Eine experimentell beobachtete Migration präformierter Ionen (s.u.) könnte dadurch, ohne Verlust der positiven Eigenschaften der Zellpuffer, vermutlich minimiert werden.

**Untersuchung strukturierter artifizieller Oberflächen:** Die Strukturierung von Oberflächen ermöglicht es, in räumlich bekannten Systemen massenspektrometrische Untersuchungen hinsichtlich der Verteilung von Analyten durchzuführen. Hierzu wurden nachträglich strukturelle Elemente auf *dried droplet*-Präparationen aufgebracht (z.B. TEM Gitter) oder direkt vorstrukturierte Probenträger (z.B. geätzte Silizium Wafer) verwendet. Die Wafer bieten den Vorteil, dass geätzte Vertiefungen durch die Matrixlösung gefüllt werden. Es ergibt sich somit eine nahezu plane Probenfläche. Die nachträgliche Strukturierung durch Gitter impliziert einen Niveauunterschied der Probe. Wird das Gitter frei von Analyt aufgebracht, führt dieser Niveauunterschied zu einer Erhöhung des Kontrastes im späteren *image*. Zusätzlich beinhaltet der Niveauunterschied einen systematischen Fehler (Fokussierung/Defokussierung auf jeweils eine Ebene).

Die Untersuchungen an Gitterpräparationen wurden stets mit analytfreiem Gitter durchgeführt (siehe Abb.5.29, S.156 und Abb.5.33, S.160)). Messungen mit dem LTQ MS und dem FT MS zeigten, dass die dabei desorbierte Analytmenge von  $\approx 40 \cdot 10^{-18}$  mol, auf einer Fläche von  $\approx 44 \mu\text{m}^2$  ( $\approx 7,5 \mu\text{m}$  Ø), nicht ausreichte, um qualitativ hochwertige massenspektrometrische Verteilungsbilder mit dem FT MS zu erzeugen. Im Gegensatz hierzu konnten sehr kontrastreiche *images* mit dem LTQ MS erzielt werden. Die niedrigere Empfindlichkeit des

FT MS ist vermutlich bedingt durch Ionentransferverluste zwischen LTQ und FT-ICR Massenanalysator (Gibson et al., 2007). Die Ionen müssen, um vom LTQ MS zur FT-ICR Zelle zu gelangen, eine Strecke von etwa 1,5m zurücklegen.

Die Untersuchungen an artifiziellen, strukturierten Probenoberflächen warfen neue Probleme in Bezug auf Geräteempfindlichkeit und analytische Fragestellungen auf. Zur Erhöhung der Empfindlichkeit des AP-SMALDI Aufbaus waren direkte Veränderungen am MS von vorn herein ausgeschlossen. Deshalb mussten andere mögliche Ansatzpunkte zur Problemlösung gefunden werden. Einige der Aspekte der Erhöhung der Empfindlichkeit, durch die Steigerung der Ionentransfereffizienz in der Ionenquelle selbst, wurden bereits in Kapitel 5.2 (S.121) diskutiert. Mögliche weitere Ansatzpunkte zur Erhöhung der Empfindlichkeit ergaben sich in der Veränderung der selbst entwickelten Hard- und Softwarekomponenten, die Teil des Steuerkreises zur Rasterung sind (siehe Kapitel 5.1.7, S.112). Die Modifikationen betrafen das MCP und den USB-Controller (s.u.). Die erfolgreiche Modifikation des MCP ermöglichte die Summierung von Einzelschussspektren von einer Probenposition, was jedoch auch eine Modifikation der *imaging*-Software Mirion erforderte. Die Qualität der Spektren verbesserte sich hierdurch. Die Ionenmenge pro Spektrum wurde hingegen nicht erhöht. Trotzdem gelang es, bei der MS<sup>2</sup> Untersuchung eines geätzten Silizium Wafers mittels LTQ MS, *images* von Fragmentationen zu erstellen (siehe Abb.5.32, S.159). Neben der Untersuchung von Proben durch MS<sup>2</sup> Messungen, bei denen ein einziges m/z Verhältnis fragmentiert wird, können z.B. auch zwei MS<sup>1</sup> Spektren über den vollen Massenbereich gefolgt von zwei MS<sup>2</sup> Spektren aufgenommen werden. Dies ist durch eine programmierte *instrument method* möglich (Thermo Fisher Scientific, 2009). Jedoch konnte gerade bei diesen Messungen mit mehreren Laserpulsen auf eine Probenposition festgestellt werden, dass die Signalintensität beim dritten Puls bereits merklich sinkt. Dies war vor allem dann zu beobachten, wenn die Signalintensität beim ersten Puls besonders hoch war. Dies deutet auf eine gute Laserfokussierung und damit eine starke Ablation während der ersten beiden Laserpulse hin (Vaeck und Gijbels, 1990a). Die Mehrfachdesorption an der gleichen Probenposition führt, mit dem verwendeten Laser und der verwendeten Laseroptik, zur Ablation in erheblicher Tiefe.

Bei homogenen, artifiziellen Proben ist dies nur unter bestimmten Umständen relevant. Bei biologischen, kompartimentierten Proben erreicht man dadurch jedoch tiefer liegende Strukturen unterhalb der Lipidmembran (Dimension der Lipidmembran  $\approx$  5-10 nm; Fettiplace et al., 1971). Diese Form der Untersuchung

geht über eine Oberflächencharakterisierung hinaus hin zu einer Tiefenprofilierung. Ein weiteres grundsätzliches Problem realer biologischer Proben ist ihre inhomogene Analytverteilung. Normalerweise werden MS<sup>2</sup> Untersuchungen bei unbekannten Proben im *data dependent*-Modus (Thermo Electron Corporation, 2003) durchgeführt. Im *data dependent*-Modus entscheidet das MS autark, anhand eines sogenannten *pre-scan*, welches m/z Verhältnis fragmentiert wird. Da bei inhomogenen Proben nicht davon ausgegangen werden kann, dass ein Analytsignal, das im *pre-scan* auftaucht, auch im MS<sup>2</sup> Spektrum erneut zugegen ist, ist das Fragmentationsspektrum häufig informationslos. Die Folge sind unvollständige oder ausbleibende Fragmentationsserien, die eine Identifikation oder Sequenzierung unbekannter Peptide erschweren. Zusätzlich hierzu bevorzugen Peptide, je nach Konstitution, bestimmte Fragmentierungsmechanismen (Papa-yannopoulos, 1995). Somit treten, falls Fragmentationsspektren erzeugt werden konnten, nur bestimmte Fragmentionen auf. Außerdem sind bei MALDI Messungen häufig Matrix-Cluster in den Spektren zu beobachten. Werden diese fragmentiert, was gerade bei niedrigen Analytkonzentrationen auftreten kann, verhindert dies Fragmentationsspektren echter Peptide. Softwareseitig besteht hier jedoch die Möglichkeit, bei exakter Kenntnis der Hintergrundsignale, eine *exclusion list* mit m/z Werten zu formulieren (Thermo Electron Corporation, 2003). Die darin aufgeführten m/z Verhältnisse werden nicht im *data dependent*-Modus berücksichtigt. Auf diese Weise wäre auch die Untersuchung unbekannter Proben, bei ausreichender Probenhomogenität und -intensität, durchführbar.

**Untersuchung gedruckter Biomolekülmuster:** Mit einem geeigneten Drucker können regelmäßige Mikrostrukturen durch Druckmuster erzeugt werden. So können Mikrostrukturen aus Proteinen, Peptiden und Lipiden erzeugt werden. Die Strukturen können sich jedoch in ihrer Feinheit, aufgrund unterschiedlicher Benetzungsfähigkeit der verwendeten Lösungsmittel, unterscheiden. Bei hoher Benetzungsfähigkeit und kleinem Druckmuster besteht die Gefahr des „Ineinander-Verlaufens“. Es ist jedoch möglich Probenvolumina im nanoliter Bereich zu drucken. Die Untersuchungen an gedruckten Lipid- und Peptidmustern (Peptide in zwei unterschiedlichen Konzentrationen, 5 und 20 nL) erbrachten, zusätzlich zu den Ergebnissen an artifiziellen Proben, weitere Erkenntnisse zur Empfindlichkeit der neuen AP-SMALDI Ionenquelle. Die Ergebnisse zeigen, dass auf der Basis von mehreren Einzelschussspektren sowohl MS<sup>1</sup> Übersichtsspektren als auch anschließend MS<sup>2</sup> Fragmentationsspektren im *data dependent*-Modus von der gleichen Probenposition der 20 nL Peptidprobe aufgenommen werden konnten.

Zur weiteren Steigerung der Sensitivität des AP-SMALDI Aufbaus wurden erneut Hard- und Softwaremodifikationen durchgeführt. Diese oben bereits angesprochene Modifikation des USB-Controllers ermöglichte Multischussspektren. Die Möglichkeit zur Messung durch Multischussspektren, bei denen mehrere Laserpulse auf eine Probenposition abgegeben und die entstandenen Ionen in der LTQ gesammelt und analysiert werden, erbrachte eine beträchtliche Steigerung der Sensitivität des Aufbaus. Durch diese Erhöhung der Empfindlichkeit wurden sogar die Erstellung von *images*, anhand von MS<sup>2</sup> FT-ICR Messungen der 20 nL Peptidprobe, möglich. Da auch Multischussspektren zur Tiefenprofilierung führen, gelten auch hier die oben bereits genannten Aspekte. Letztendlich muss also situativ entschieden werden, ob Einzelschussspektren zur Messung genügen oder ob man den Zugewinn an Empfindlichkeit benötigt.

Bei der Interpretation der Ergebnisse an gedruckten Biomolekülmustern ist Folgendes zu berücksichtigen: die Analyten wurden unter Verwendung eines gewissen Anteils an Matrix gedruckt und nochmals über *Airspray* mit zusätzlicher Matrix nachbesprüht. Dies spiegelt sich vor allem in den Ergebnissen der Analyse der gedruckten Lipidmuster wieder. Die nachträglich aufgebrachte, zusätzliche Matrix führt dazu, dass auch innerhalb und außerhalb der Druckpunkte („Druck-Krater“) befindlicher Analyt massenspektrometrisch erfasst wird. Es wurden also Teile des Analyten messbar, die nach dem Druckprozess nicht mit Matrix Co-kristallisiert waren. Neben der ohnehin bei derartigen MALDI-Präparationen bekannten Kristallisationsfraktionierung (Bouschen und Spengler, 2007) könnte zusätzlich noch eine Hydrophobizitätsfraktionierung wirksam gewesen sein. Hinweise hierauf ergeben sich aus den Ergebnisse der 20×60 Pixel Untersuchung des gedruckten 20 nL Lipidmusters (siehe Abb.5.34, S.162). Eher apolare Spezies wie das Cholesterin oder das Natrium-Adduktion des PC 34:1 sind außerhalb der „Druck-Krater“ in dem Bereich zu finden, der erst durch das Nachbesprühen mit Matrix sichtbar wurde. Das in diesem Bereich durch einen evtl. Mangel an Matrix jedoch auch härtere Desorptionsbedingungen zu herrschen scheinen, wird durch das gleichzeitige Auftreten der Phosphocholin-Kopfgruppe deutlich. Anders im Innern der „Druck-Krater“, hier entstehen vor allem unfragmentierte Ionen des PC 34:1 und dessen Dimer. Mögliches *collisional cooling* scheint hier zu intakten Ionen und Dimeren zu führen (Vertes et al., 1990; Karas und Krüger, 2003; Loboda und Chernushevich, 2005).

Das Auftreten der Phosphocholin Kopfgruppe des PC 34:1 erfolgte bei der eben diskutierten 20×60 Pixel Untersuchung ohne Anwendung von Kollisionsenergie.

sionsenergie. Phosphatidylcholin neigt dazu, schon allein durch die applizierte Laserenergie zu merklicher Fragmentierung. Die entstehende Kopfgruppe weist ein  $m/z$  von 184,07 Da als  $[M+H]^+$ -Ion auf. Weitere mögliche Fragmente spielen beim Zerfall von Phosphatidylcholin eine untergeordnete Rolle, wie Abb.5.35 (S.163) zeigt. Die Summierung von 814 Spektren verdeutlicht, neben dem Vorläuferion und der Phosphocholin-Kopfgruppe, lediglich minimale Massensignale der weiteren Fragmente. Auch andere Membranbestandteile weisen beim Zerfall, sei es nun spontan oder im CID Experiment, ähnlich leichte Kopfgruppen auf. Ein technisches Charakteristikum von Ionenfallen-Massenspektrometern, der sogenannte *low mass cut off*, stellt hierbei ein Problem dar. Dadurch können Fragmente, die während CID Experimenten erzeugt werden und weniger als 25 % der Masse des Vorläuferions aufweisen, nicht stabil in der Ionenfalle gehalten werden. 25 % von 760,5 Da (Masse PC 34:1  $[M]^+$ -Ion) sind 190 Da. Dadurch wird die Fragmentionenanalyse, gerade von Molekülen eines ähnlichen Aufbaus wie PC 34:1, deutlich beeinträchtigt. Bestimmte Gerätekonfigurationen und neuere Fragmentierungstechniken könnten hierbei hilfreich sein (Yang et al., 2009). Die Stabilität des Phosphatidylcholins reicht jedoch aus, um es im FT-ICR MS nachweisen zu können (siehe Abb.5.36, S.164), ohne dass das Signal durch metastabilen Zerfall während des Ionentransfers vom LTQ MS zum FT MS verschwindet.

Die gedruckten Peptidmuster wiesen, im Gegensatz zu den Lipidmustern, eine höhere Druckqualität auf. Im Unterschied zu den Lipiddruckmustern waren sowohl die 5 nL als auch die 20 nL Präparation der Peptide nur marginal verlaufen. Die massenspektrometrischen Verteilungsbilder bestätigen dies. Jedoch zeigte die 20 nL Peptidpräparation erhebliche Niveauunterschiede.

Berechnungen der verbrauchten Analytmenge bei Untersuchungen der 5 nL und 20 nL Probe, für einen Desorptions-Laserfokusdurchmesser von  $7\text{ }\mu\text{m}$ , ergaben  $90 \cdot 10^{-18}$  mol/ Desorptionsort (5 nL Probe) bzw.  $200 \cdot 10^{-18}$  mol/Desorptionsort (20 nL Probe). Damit lag die Empfindlichkeit bei Untersuchungen der 5 nL Peptidpräparation niedriger als bei Zellpuffer Präparationen und ist konsistent mit den bereits diskutierten Ergebnissen. Die Analytmenge bezieht sich auf das am höchsten konzentrierte Peptid (Bradykinin 1-5;  $2 \cdot 10^{-6}$  mol/L). Mögliche Kalkulationsfehler der verbrauchten Analytmenge, durch den Flächen- statt Volumenbezug bei der Berechnung, wurden ebenfalls bereits diskutiert. Die bei der Erstellung der 20 nL Peptidpräparation verwendete Auftragungstechnik ( $4 \times 5$  nL statt  $1 \times 5$  nL mit der 4-fachen Konzentration) erschwert derartige Berechnungen zusätzlich, da vor allem das Volumen eines Druckpunktes zugenommen haben

musste, nicht wie gewünscht, die Konzentration. Die Auftragung wurde nicht im Haus, sondern in einem kooperierenden Institut durchgeführt.

Im Hinblick auf die Niveauunterschiede der Probenoberfläche ergibt sich, verursacht durch die Sensitivitäts-Unterschiede des LTQ MS und des FT MS, ein wichtiger Punkt für die Beurteilung der Qualität von SMALDI *images*. Die Ergebnisse zeigen, dass mit dem LTQ MS, bei allen gedruckten Peptidkonzentrationen, Verteilungsbilder erstellt werden konnten. Die mit dem LTQ MS erzeugten Verteilungsbilder zeigen, egal ob diese auf der Basis von Einzelschuss- oder Multischussspektren entstanden, graduelle Übergänge entsprechend den Konzentrationsunterschieden des Analyten auf der Probenoberfläche sensitiv an (siehe Abb.5.37, S.166). Suboptimale Ionisationsbedingungen durch leichte Defokussierung, wie sie bei erhobenen Proben auftauchen, führen nicht zum vollständigen Ausbleiben des Ionensignals. Natürlich relativiert sich hierdurch, auch bei LTQ MS Untersuchungen, die quantitative Aussagekraft der Verteilungsbilder, aber es wird immerhin eine Verteilung angezeigt.

Bei Untersuchungen mit dem FT MS ist dies nicht der Fall. Bereits bei den Untersuchungen der vorhandenen Lipid- und Peptidproben führten Messungen mit geringfügig suboptimalen Ionisationsbedingungen (leichte Laser-Defokussierung) zum Ausbleiben der Massensignale. Bei den untersuchten gedruckten Peptidmustern bedeutet das, dass man entweder die Grate der „Druck-Krater“ oder die Fläche innerhalb der Krater untersuchen kann. Andernfalls ist die Qualität des Fokus zu niedrig, um ausreichend Ionen für die FT-ICR Zelle zu erzeugen. Das FT MS erzeugt dabei vermeintlich schärfere Bilder mit sehr diskreter Analytverteilung (siehe Abb.5.39, S.168 und Abb.5.40, S.169). Es benötigt jedoch lediglich eine größere Ionenmenge. Unter suboptimalen Ionisationsbedingungen erzeugter Analyt wird, aufgrund der niedrigen Sensitivität, nicht mehr erfasst, obwohl dieser nach wie vor vorhanden ist. Untersuchungen mit dem empfindlicheren LTQ MS, sowohl der 5 nL als auch der 20 nL Peptidpräparation (Daten 20 nL nicht gezeigt), zeigen die Verteilung des Analyten auf den Außenseiten der Grate, auf den Graten der „Druck-Krater“ selbst und innerhalb der Krater. Bei der Untersuchung erhobener Proben ist also, je nach verwendetem Massenspektrometer, mit Artefakten durch die limitierte Rayleigh-Länge des Laserfokus und unterschiedliche Empfindlichkeit des MS zu rechnen.

Die unterschiedliche Sensitivität der Massenspektrometer soll nochmals kurz in konkreten Zahlen ausgedrückt werden. Die Analysen mit dem LTQ MS wurden über Einzelschussspektren durchgeführt und daraus *images* erstellt. *Images*

aus FT MS Daten konnten erst nach Modifikation des USB Controllers erzeugt werden. Dabei wurden die Ionen von mindestens 5 Laserpulsen gesammelt und anschließend im FT-SIM Modus untersucht. Der FT-SIM Modus benötigt 2,5-mal so viel Ionen, wie *full range* Messungen mit dem LTQ MS ( $m/z$  150-2000 Da). FT MS<sup>1</sup> Messungen über einen größeren Massenbereich ( $m/z$  200-1100 Da) bzw. FT MS<sup>2</sup> Messungen konnten nur an der höher konzentrierten 20 nL Präparation durchgeführt werden. Dazu sind etwa 5 bis 12-mal mehr Ionen notwendig, als mit dem LTQ MS. Diese theoretischen Unterschiede auf der Basis der *target*-Werte (Thermo Electron Corporation, 2004) stimmen gut mit den experimentellen Beobachtungen in Bezug auf die Empfindlichkeit überein. Die Applikation von fünf aufeinander folgenden Laserpulsen, zusammen mit der höher konzentrierten Probe, sollte eine 5 bis 10-fache Steigerung der desorbierten Ionenmenge bewirkt haben. (Cohen und Chait, 1996) und (Bouschen, 2004) beschreiben die Möglichkeit einer inhomogenen Kristallisation bei Standard MALDI Proben. Dies könnte zu einer Peptidanreicherung in den oberen, analytisch zugänglichen Matrixschichten geführt und damit die Analytmenge zusätzlich erhöht haben. Dies hätte eine stärkere Erhöhung der desorbierten Ionenmenge als die berechnete 5 bis 10-fache zur Folge.

Die Abbildungen 5.40 B und Abb.5.40 C (S.169) wurden auf der Basis von FT MS Daten erzeugt und zeigen die Verteilung des  $[M+H]^+$ -Ions von Bradykinin 1-5 gegen die Verteilung des  $[4DHB-2H_2O]^\bullet+$  Matrix-Clusterions. Die *images* bestätigen die eben getroffene Aussage, dass mit dem FT MS erzeugte Verteilungsbilder diskretere Verteilungen aufweisen sollten. Die Abweichung der *images* vom lichtmikroskopischen Referenzbild spricht entweder für eine tatsächlich erfolgte inhomogene Co-Kristallisation, wie sie auch durch Spengler und Hubert (2002) und Bouschen und Spengler (2007) beschrieben wird, oder für das bereits angesprochene Phänomen eines Artefaktes bei FT *images*.

Bereits bei der Diskussion der Ergebnisse der gedruckten Lipidmuster wurden die Aspekte, die für die MALDI MS<sup>2</sup> Untersuchung im *data dependent*-Modus relevant sind, diskutiert (Probeninhomogenität, Matrix-Clusterionen, *exclusion list*). Zuverlässige und kontinuierliche Fragmentionsserien sind wohl über diesen Untersuchungsmodus, bei Untersuchungen von MALDI Proben, nicht zu erwarten. Rasternde Untersuchungen dieser Art könnten jedoch zum Auffinden möglicher biomolekularer Kandidaten, die vereinzelt in MS<sup>2</sup> Spektren auftreten, genutzt werden. Das Messungen im *data dependent*-Modus prinzipiell möglich sind zeigt das LTQ MS Spektrum in Abbildung 5.38 (S.167).

**Vorbereitung und Präparation biologischer Proben:** Die präparativen Schwierigkeiten biologischer Proben liegen, zweifelsohne, in der simultanen Erfassung unterschiedlicher Klassen von Biomolekülen durch die Massenspektrometrie. So weisen Lipide andere Löslichkeitseigenschaften als Proteine oder Peptide auf. Jedoch bestehen auch innerhalb der Analytklassen, z.B. bei Proteinen, Unterschiede in dieser Hinsicht. Transmembrandomänen großer Proteinkomplexe weisen eine heterogene Aminosäurezusammensetzung auf und werden sowohl von apolaren als auch polaren Aminosäuren gebildet. Die apolaren Domänen befinden sich im *lipid bilayer*, während die polaren Domänen in das Cytoplasma der Zelle ragen. Lösliche Proteine zeichnen sich ebenfalls durch nach außen ragende, polare Aminosäurereste aus (Eilers et al., 2002; Page et al., 2007).

Der Versuch der selektiven Entfernung von Membranlipiden durch unpolare Lösungsmittel kann also durchaus auch zum Verlust apolarer Peptide bzw. Proteine führen. Die Vorbereitung biologischer Strukturen wie Zellen und Gewebe, bei denen Proteine und Membranlipide eng benachbart vorkommen, ist also nicht einfach durchführbar. Die Vorbereitung hängt vom jeweiligen analytischen Ziel ab. Erkenntnisse über die Fixierung vitaler Stadien von Zellen und Geweben aus der klassischen Histologie sind dabei nur begrenzt übertragbar. Häufig werden hier stark quervernetzende und chemisch modifizierende Fixanzen wie Glutaraldehyd und Formaldehyd verwendet. Diese führen zwar zu einer sehr guten Stabilisierung der biologischen Strukturen, gerade zwischen Proteinen und Proteindomänen, die dabei erfolgenden kovalenten Modifikationen führen jedoch entweder zu einer Signalverschiebung eines Massensignals oder gar zu dessen Ausbleiben. Hinzu kommt eine evtl. Unzugänglichkeit für proteolytischen Abbau, da dabei eine Modifikation oder Maskierung von Spaltstellen erfolgte. Dies macht diese Fixierungen ungeeignet für die Massenspektrometrie. Die Fixierung kann deshalb nur mit Reagenzien erfolgen, die nicht oder nur wenig zur kovalenten Modifikation und Vernetzung der vorhandenen Strukturen führen. Hierzu zählt die Fixierung mittels Aceton + 10 % Eisessig (Moloney et al., 2004). Die Fixierung führt zur Entfernung von Membranlipiden, während Proteinstrukturen, vermutlich durch Denaturierung durch starke Entwässerung, erhalten bleiben. Auch dieses Fixierungsverfahren stellt also extreme Bedingungen für biologische Strukturen dar, modifiziert aber nicht kovalent.

Die mikroskopische Kontrolle der so vorbereiteten Zellkulturen ergab, dass die Verwendung von Aceton + 10 % Eisessig hierfür ungeeignet ist. Die Zellen werden meist fast vollständig vom Substrat entfernt und es bleibt nur ein ver-



laufener Rest der unteren Zellmembran zurück (siehe Abb.5.42, S.173). Ebenso extreme Bedingungen sind durch die Verwendung von Chloroform, Xylol oder Toluol gegeben. Auch diese Lösungsmittel führen bei Zellkulturzellen fast zum vollständigen Verlust der Probe. Wie bereits erwähnt sollte, vor der Zell- oder Gewebevorbereitung.

Die Absicht der drei für Zellkulturen verwendeten Vorbereitungsprotokolle war es, die analytische Zugänglichkeit sowohl der Lipid- als auch die Proteinstrukturen zu ermöglichen. Sie stellen also einen Kompromiss bei der Vorbereitung dar. Die mikroskopische Kontrolle der Vorbereitung mit Waschprotokoll 1 zeigt, dass dieses zu stringent für Zellen ist. Zellverluste und verlaufene Zellränder verdeutlichen dies. Die beabsichtigte Entwässerung und Anfixierung der Zellen mit 25 % Ethanol ist nur auf Kosten der Zellzahl und Membranstruktur zu realisieren. Zur Senkung der Stringens wurde die Anzahl der Waschschrte und teilweise der Alkoholanteil gesenkt, so dass mehr Zellen unverlaufen erhalten blieben. Die in dieser Arbeit aufgeführten Waschprotokolle liefern gute, aber verbesserungsfähige Ergebnisse. Der Kompromiss, Proteine und Lipide in der Vorbereitung gleichzeitig konservieren zu können, ist nur durch wässrige oder schwach alkoholische Lösungen zu erzielen. Eine Beseitigung der Lipidmembran bedeutet auch gleichzeitig eine Delokalisierung der Proteine. Sollen auch feine biologische Strukturen einzelner Zellen, z.B. dendritische Fortsätze, weitestgehend erhalten bleiben, ist eine Herangehensweise über das native Milieu Wasser unerlässlich. Der Zusatz niedriger Konzentrationen an organischen Lösungsmitteln, wie z.B. Ethanol, kann dabei schon zu Veränderungen der Zellmembran führen (Paterson et al., 1972; Kranenburg und Smit, 2004). Deshalb bietet sich gerade bei zellulären Strukturen die Vorbereitung mit lösungsmittelfreien, isotonischen Lösungen, z.B. 0,3 mol/L D(-)Mannitol, und eine leichte Entwässerung über 10 % Ethanol an. Die leichte Entwässerung ist für eine abschließende Waschung mit dest. H<sub>2</sub>O unabdingbar, um ein Platzen der Zellen (Deplasmolyse) zu verhindern, auch wenn bereits niedrige Alkoholkonzentrationen eine destabilisierende Wirkung auf die Lipidmembran haben (Venturolia et al., 2006). Eine selektive Entfernung der Lipide in wässrigem Milieu könnte durch den Einsatz von Lipasen erzielt werden. Eine Beeinträchtigung des Cytoskeletts sollte dadurch nicht erfolgen (Haase et al., 1993; Sonesson et al., 2007; Balashev et al., 2007). Mit dem Cytoskelett assoziierte Proteine behielten somit ihre ursprüngliche Position und wären so dem proteolytischen Abbau und damit dem MS *imaging* zugänglich.

Tierische Gewebe sind, wie bereits erwähnt, robustere biologische Systeme

me. Die Zellen innerhalb von Geweben sind durch interzelluläre Strukturen miteinander verbunden. Die oben beschriebenen Probleme der Probenvorbereitung treffen also, in gemilderter Form, auch für Gewebszellen zu. Die Verwendung stark lipophiler Lösungsmittel führt hier zwar nicht zu einem kompletten Verlust der Probe, partielle Verluste sowohl bei Lipiden als auch Proteinen/Peptiden sind aber zu erwarten. Zusätzlich ist mit Migration der zellulären Komponenten zu rechnen.

Die unterschiedlichen verwendeten Gewebevorbereitungen mit Alkohol (50 und 70 %ig) oder Chloroform zeigen ähnliche Veränderungen bei den behandelten Dünnschnitten. Die dehydratisierende Wirkung dieser Lösungsmittel führt zu einem Schrumpfen und Reißen der Gewebeschnitte. Die Problematik an der Verwendung von stark dehydratisierenden Lösungsmitteln wird hier deutlich. Anders verhält es sich bei den mit Aceton + 10 % Eisessig behandelten Dünnschnitten. Hier verhindert offensichtlich die schwach fixierende Wirkung der Mischung das Reißen des Gewebes. Obwohl ethanolische Lösungen einen Kompromiss in Bezug auf die Erhaltung von Proteinen und Lipiden darstellen, wird auch hier, in den massenspektrometrischen Verteilungsbildern der so vorbereiteten Gewebe, eine deutliche Migration des Phosphatidylcholins deutlich. Die Delokalisierung der Membranlipide durch Chloroform und Aceton + 10 % Eisessig wird ebenfalls sichtbar. Alle verwendeten organischen Lösungsmittel führen mehr oder minder zur Delokalisierung der Membranlipide, deshalb entscheidet auch hier erneut die analytische Fragestellung über die Rigidität der Vorbereitung.

Einen interessanten Ansatz für die Vorbereitung von Geweben liefert die Vorgehensweise von Agar et al. (2007). Hier wird die Matrix in Fixierungslösung gelöst aufgetragen. Die verwendeten Lösungsmittel lösen schlecht Proteine, genügen jedoch, um ausreichend Verunreinigungen zu entfernen. Verwendet wird eine Mischung aus Ethanol/Methanol/Acetonitril/TFA in Wasser (2:2:1:1) mit gelösten 25-30 mg/mL Matrix. Die Methode basiert auf klassischen Zellfixierungsverfahren, die vor allem auf die Konservierung von Proteinstrukturen abzielen. Die Applikation der Matrix, zusammen mit der Fixierungslösung, führt zur Minimierung des Kontakts der Probe mit Flüssigkeit und damit zu gesenkter Migration. Die in der Publikation aufgeführten Massenspektren sind allerdings Summenspektren aus 500 Laserpulsen auf der Basis einer lateralen Auflösung von lediglich 100-150  $\mu\text{m}$  Laserfokusedurchmesser.

**Biologische Proben:** Die Diskussion der Untersuchungsergebnisse der Zellkulturproben erstreckt sich hauptsächlich auf deren Vorbereitung (siehe S.198).

Die massenspektrometrischen Verteilungsbilder, die mit einer effektiven lateralen Auflösung  $<9\text{ }\mu\text{m}$  erzeugt wurden, zeigen die Verteilung des wichtigen Membranbestandteils Phosphatidylcholin 34:1 (PC 34:1) (Brügger et al., 1997). Die Authentizität der erzeugten *images* zeigt sich am ehesten im Vergleich mit den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen. Die Zellen sind anhand ihrer deutlich unterschiedlichen Autofluoreszenz (hellgrün), im Gegensatz zum 2,5-DHB (blau), erkennbar. Wie bereits diskutiert konnte die Zellvorbereitung, im Hinblick auf eine Reduktion des „Konturverlusts“ durch die Vorbereitung, verbessert werden. Dennoch traten stets lysierte und verlaufene Zellen auf, die die erzeugten massenspektrometrischen Verteilungsbilder beeinträchtigten. Einen Eindruck hierzu vermittelt Abbildung 5.45 (S.177).

Der Zellpuffer selbst bietet, im Hinblick auf die massenspektrometrische Untersuchung biologischer Proben, jedenfalls beste Voraussetzungen für eine authentische Präparation. Die Zellen werden von einer feinen Matrixschicht umschlossen, wie dies die Abbildungen 5.24 (S.147) und 5.25 (S.147) demonstrieren.

Die instrumentelle Weiterentwicklung der AP-SMALDI Ionenquelle, durch die Modifikation des USB-Controllers (Multischussspektren), ist für Zell- und Gewebeproben unterschiedlich zu bewerten. Zwar wurde bei der Untersuchung von Zellproben ein Sensitivitätsgewinn erzielt, dieser ist jedoch nicht so groß wie bei Gewebeproben. Der Laser kann bei Gewebeproben tiefer eindringen als bei Zellproben und so mehr Probenvolumen ablatieren (Vaeck und Gijbels, 1990a,b). Der Mehrfachbeschuss mit fünf Laserpulsen desorbierte bei Zellproben häufig bis auf den Probenträger. Auch wenn dies zur Analytmischung führt (Membran- und Cytoplasmabestandteile), wird die maximal mögliche Analytmenge gewährleistet. Zudem sind während der Präparation gebildete Phasen gegenstandslos, da diese komplett desorbiert werden.

Die Präparation von Geweben mit Zellpuffer verlief teilweise etwas aufwendiger als die von Zellproben. Wurden Gewebe mit Zellpuffer präpariert, musste häufig mit *Airspray* nachbehandelt werden. Der aufgetragene Zellpuffer neigte auf Geweben, nach vollständiger Trocknung, weniger zur Kristallisation. Eine mögliche Erklärung könnte eine für Gewebe unzureichende Matrixmenge im Zellpuffer gewesen sein. Andererseits spielte auch die Art der Vorbereitung eine Rolle. Nach der Vorbereitung mit lipophilen Lösungsmitteln kristallisierte der Zellpuffer besser aus als nach der Vorbereitung mit z.B. ethanolisch-wässrigen Lösungen. Dies deutet auf einen Effekt der Membranlipide auf das Erstarrungs- bzw. Kristallisationsverhalten hin. Das derartige Additive eine

Wirkung auf flüssige Matrixgemische haben können, wird auch bei Cramer und Corless (2005) gezeigt. Untersuchungen weiterer Gewebepräparationen (Ergebnisse nicht gezeigt) zeigten eine ausreichende Matrixmenge im Zellpuffer (ZP2a) und dessen autarke vollständige, homogene Erstarrung. Zellpuffer 2a weist die höchste 2,5-DHB Konzentration auf und ist deshalb am besten für Gewebe geeignet.

Eine bereits vorher analysierte Probe, einer mit *T. spiralis* kontaminierten Rattenwange, wurde mit 50% Ethanol vorbereitet und mit Zellpuffer 2 präpariert. Durch die Vorbereitung mit Alkohol entstanden auch hier Risse im Gewebe. Das entstandene *image* zeigt die Verteilung des PC 34:1 und der Phosphocholin Kopfgruppe, sowohl auf dem Gewebe als auch in den Rissen. Es fand also Migration durch Vorbereitung und/oder Präparation statt. Nichts desto trotz zeigt das *image* eine besonders hohe Konzentration des PC 34:1 Matrixadduktions in der direkten Umgebung des Endoparasiten *T. spiralis* und innerhalb dessen Kapsel. Endoparasiten verursachen bei den meisten Wirten eine Entzündungsreaktion. Die erhöhte Lipidkonzentration könnte also mit einer gesteigerten Immunantwort der Ratte und der dadurch erhöhten Zellkonzentration in Verbindung stehen (Gamito-Santos et al., 2009). Wobei hiermit die erhöhte PC 34:1 Konzentration innerhalb der Kapsel nicht erklärt werden könnte. Allerdings weisen ältere Untersuchungen auf die Anwesenheit von Phosphatidylcholinen im innern des Kapselbereiches hin (Gounaris et al., 1996). Die Ionensignale korrelieren zudem mit den Stellen, an denen eindeutig die Kristallisation des Zellpuffers eingetreten ist. Hierdurch wird erneut gezeigt, dass die Desorption und Ionisation nur im festen Aggregatzustand der Matrix bzw. des Analyt-Matrix-Kristalls funktioniert.

Bei der Untersuchung der Mäusedünnschnitte mit internem Peptidstandard wurde ebenfalls nachträglich Matrix durch *Airspray* aufgetragen, um eine Kristallisation auszulösen, obwohl zwei der vier Gewebeschnitte mit ZP2a präpariert worden sind. Die Vorbereitung und Präparation wurde hier auf verschiedenliche Weise durchgeführt. Unterschiedliche Waschmethoden und die Präparation mit reinem *Airspray* und Zellpuffer 2a + *Airspray* lieferten sehr unterschiedliche Ergebnisse im Hinblick auf die Nachweisbarkeit der internen Standardpeptide. Die mit ZP2a + *Airspray* präparierten Dünnschnitte lieferten die höchsten Messsignale im Vergleich zu den nur *Airspray* präparierten. Diese Beobachtung steht jedoch nicht im Zusammenhang mit einem günstigeren Matrix-Analyt Verhältnis bei den mit ZP2a präparierten Dünnschnitten.

Nur das am höchsten konzentrierte Peptid Bradykinin 1-7 konnte auf allen Dünnschnitten nachgewiesen werden. Die Signalintensität des am zweithöchsten konzentrierten Peptids Bombesin war, merkwürdigerweise, ebenso hoch wie die des am niedrigsten konzentrierten *Anti inflammatory peptide*. Bombesin könnte selektiv von der Oberfläche der Schnitte gebunden worden sein oder lässt sich vergleichsweise schlechter ionisieren. Die Signale der niedriger konzentrierten Peptide waren nur auf den Dünnschnitten S1, S2 und S3, unter Summierung einiger Spektren, erkennbar. Die mit Abstand höchste Signalintensität war auf S2 feststellbar. Die Signalmaxima korrelieren bei allen Schnitten mit den Stellen, an denen massiv Material ablatiert wurde. Dies trifft auch für das Lipidsignal i.e.S. PC 34:1 zu. Die Tatsache, dass eine möglichst vollständige Probendesorption die Voraussetzung für ein gutes Messsignal darstellt, könnte dadurch bedingt sein, dass die Peptide in das Gewebe eingedrungen sind. Somit würde eine ausreichende Analytmenge erst bei vollständiger Probendesorption für die nachfolgenden Gasphasenreaktionen erzeugt (Karas et al., 2000; Knochenmuss et al., 2000; Spengler und Kirsch, 2003; Karas und Krüger, 2003; Knochenmuss und Zenobi, 2003; Zhang und Zenobi, 2004; Jaskolla und Karas, 2008). Die alleinige Auftragung der Matrix muss also nicht sofort zur vollständigen Inkorporation des Analyten führen, diese könnte aber beim Zellpuffer, belegt durch die höhere Signalintensität, besser verlaufen sein.

Aus Tabelle 5.7 (S.184) wird ersichtlich, dass die stärkere Entfernung der Lipide zu einem höheren Peptidsignal führt. Das formulieren allgemein gültiger Aussagen, über das Verhalten von Peptiden und Lipiden zueinander, ist dennoch schwerlich möglich. Hierfür bietet das durchgeführte Experiment nicht den geeigneten Rahmen. Die Präparation ist zu inhomogen und das Milieu zu komplex, um belastbare Aussagen treffen zu können.

Unabhängig von den bisher geschilderten experimentellen Beobachtungen, die für die Mäusedünnschnitte formuliert wurden, existieren übergeordnete Faktoren, die die Vergleichbarkeit und einheitliche Interpretation der zuletzt diskutierten Ergebnisse erschweren. Zunächst einmal schränkt die Vorbereitung der Gewebe, die zur Schrumpfung und zum Reißen führte und so Vertiefungen für die wässrige Peptidlösung schuf, die Vergleichbarkeit ein. Die Untersuchungen zeigen wie wichtig die Authentizität des Gewebes ist—Schrumpfungen und Risse sind zu vermeiden. Die Peptide konnten so partiell akkumulieren (siehe Abb.5.47, S.182 S3 und S4). Eine Akkumulation der Peptide in den Vertiefungen bedeutet aber umgekehrt, eine Herabsetzung der Konzentration auf der Gewebefläche. Bei allen präparierten Schnitten konnte das am höchsten konzen-

trierte Peptid Bradykinin 1-7 zweifelsfrei auch auf den Gewebeflächen, nicht nur in den Vertiefungen, nachgewiesen werden. Das nächst niedriger konzentrierte Peptid Bombesin konnte jedoch lediglich auf zwei Schnitten nachgewiesen werden. Die Messempfindlichkeit, über alle Schnitte, ist demnach etwas unterhalb der Konzentration des Bradykinins. Ein weiterer einschränkender Faktor für die Vergleichbarkeit ist die flüssige Auftragung des Zellpuffers. Bei den mit Zellpuffer präparierten Schnitten wurde so, im Gegensatz zur reinen *Airspray* Präparation, die Möglichkeit zu stärkerer Migration des Analyten geschaffen. Diese ist in den Verteilungsbildern, sowohl für die Peptide als auch für PC 34:1, zu beobachten. Die flüssige Auftragung erhöht die Möglichkeit der Durchmischung, aber auch der Migration. Zusammen mit der erhöhten Löslichkeit von Proteinen/Peptiden, durch die Gegenwart von D(-)Mannitol, erklärt beides die beobachtete höhere Signalintensität bei den mit Zellpuffer präparierten Schnitten (siehe Tabelle 5.7, S.184).

Nichts desto trotz konnte experimentell bereits die höhere Signalintensität bei Peptiden in *dried droplet* Zellpuffer Präparationen, im direkten Vergleich zu Standard 2,5-DHB MALDI Präparation, gezeigt werden (siehe Tabelle 5.6, S.153).

Auf der Basis dieser experimentellen Ergebnisse ist es deshalb schwierig zu sagen, ob die beobachtete höhere Signalintensität der Zellpufferpräparationen, vor allem bei Dünnschnitt S2, ein Artefakt der unterschiedlichen Auftragung oder ein Vorteil gegenüber der Standard Präparation ist. Sie stellt dennoch, unter bestehenden experimentellen Bedingungen, das Optimum für den Peptidnachweis dar. Dieses liegt konkret bei einer berechneten Peptidmenge (Bradykinin 1-7) von mindestens  $50 \cdot 10^{-18}$  mol/Desorptionsort, die zu eindeutigen Massensignalen in den Massenspektren führt.

Die gesteigerte Migration der Standardpeptide, durch die Art der Aufbringung des Zellpuffers, wurde bereits diskutiert. Dieser Gesichtspunkt ist z.B. für die Untersuchung neurologischer Gewebe mit präformierten Neuropeptiden zu beachten. Hier könnte die bereits angesprochene Zellpufferapplikation mittels Ultraschallverneblung eine sehr gute Alternative bieten. Allerdings wurde bei den durchgeführten Vorversuchen nicht explizit der Effekt auf die Analytmigration untersucht. Ein Problem ist zudem die große Menge an zu vernebelnder Flüssigkeit für kommerzielle Ultraschallvernebler (mehrere mL). Gerade für Mischungen mit Trypsin ist dies undenkbar, da der Enzymverbrauch immens und die Kosten hoch wären.

Insgesamt wurden bereits einige Ansatzpunkte zur Verbesserung der Ana-

lyse biologischer Systeme auf unterschiedlichen Ebenen genannt. Neben optimalen präparativen Voraussetzungen, für die jeweiligen Substanzen bzw. Substanzklassen, müssen apparative Gesichtspunkte berücksichtigt werden. Diese wurden bereits diskutiert (gesteigerte Sensitivität der AP-SMALDI Ionenquelle und des Massenspektrometers). Gerade für den Betrieb von AP Ionenquellen an Ionenfallen bietet sich zusätzlich der permanente, gezielte Einsatz eines Minimums an Kollisionsenergie an. Dies wird von Krutchinsky und Chait (2002) vorgeschlagen, um größere Matrix-Cluster gezielt zu beseitigen und so die Analytionen Ausbeute zu erhöhen. Eine präparative Möglichkeit zur gezielten Erstellung massenspektrometrischer Verteilungsbilder, gerade in komplexen biologischen Systemen, besteht in der Mikropräparation. Mikropräparationen dienen der Isolation bestimmter Zellen oder Gewebeteile, die z.B. ein spezielles Merkmal (krank, gesund) besitzen. Die so isolierten Strukturen können separat aufbereitet und untersucht werden. Dabei helfen Techniken wie 2-D-PAGE oder LC Auftrennung und vereinfachen die Charakterisierung über MS Messungen durch zusätzliche Auftrennung (Emmert-Buck et al., 2000; Kwapiszewska et al., 2004; Fink et al., 2006). Durch die so gewonnenen Erkenntnisse über chemische und physikalische Eigenschaften isolierter Probenkomponenten (Protein, Peptid, etc.), kann nachfolgend gezielter ein passendes Präparationsverfahren zur *imaging* Analyse entwickelt werden. Für die Untersuchung von Zellkulturzellen, in Kulturen mit niedriger Dichte, bietet sich, vor diesem Hintergrund, die *imaging* Untersuchung einzelner Zellen an. Damit könnte die Analytmigration auf die Größenordnung einer Zelle beschränkt werden. Dies wurde in eigenen Experimenten versucht. Ein Problem bestand dabei aber in der Probenwiederfindung auf dem Probenträger ohne vollautomatische x,y,z-Positionsnavigation. Zudem weist eine einzelne Zelle eine ausgesprochen niedrige Analytkonzentration auf. Dies ist selbstverständlich ein allgemeines Problem bei der Untersuchung von Zellkulturzellen. Nicht unbedingt bei den Membranlipiden als Hauptfraktion biologischer Membranen, aber vor allem bei den weniger abundanten Proteinen. Dennoch werden aktuell sensitivere Techniken zur Messung von Membranlipiden beschrieben. Mit Hilfe alkalihaltiger Matrixlösungen wird versucht, die Signalintensität gezielt in reiner Alkaliform zu erhalten. Dieser Ansatz funktioniert jedoch ausschließlich für polare Lipidspezies (Sugiura und Setou, 2009). Gerade die Probleme der Nachweisbarkeit könnten zu einer Änderung der Analysestrategie, weg von der Protein- hin zur Lipiduntersuchung, beigetragen haben. Wie auch immer, aktuelle Untersuchungen zeigen, dass Lipide in der Krebsdiagnose als Indikatormoleküle dienen können. Über ihre massenspektrometrische Quantifizierung durch *imaging* Analysen wurden

Unterschiede zwischen gesundem und Krebsgewebe sichtbar (Shimma et al., 2007). Membranlipide finden darüber hinaus, in der online-Analytik als Indikatormoleküle Beachtung. Über die Kopplung chirurgischer Instrumente (Elektro- oder Laserskalpell) mit einem Massenspektrometer konnte gezeigt werden, dass sich die Lipidsignatur an der physiologischen Grenze zwischen gesundem und Krebsgewebe verändert. Damit sind Lipide ein Indikator, die der Operateur, zur präziseren Durchführung der Operation, nutzen kann (Schäfer et al., 2009).

Die Konzentrationsunterschiede zwischen Lipiden und Proteinen in biologischen Systemen sind ein Problem, das auf unterschiedliche Weise angegangen werden kann. Eine Möglichkeit zur Senkung des Anteils an Membranlipiden, die bereits erwähnt wurde, könnte die Verwendung von Lipasen sein. Wenn es die Fragestellung erlaubt können auch organische Lösungsmittel eingesetzt werden. Außer über einen biochemischen Ansatz könnte auch eine geeignete MS-Analysesoftware eine Möglichkeit bieten. Diese könnte, unter gezielter Ausfilterung bekannter Signale und der Beseitigung von Hintergrundrauschen (Norris et al., 2007; Mantini et al., 2007), schwache Massensignale von Peptiden sichtbar machen. In den Spektren der durchgeführten Verdauexperimente konnten immer wieder vereinzelte, nicht ganz eindeutige Signale beobachtet werden, die Peptide vermuten ließen. Eine Software-basierte Unterstützung könnte hier einen geeigneten Lösungsansatz bieten.

**Fazit:** Die bereits diskutierten Aspekte zur Verbesserung der Signalintensität bei der Untersuchung biologischer Proben, sei es durch vorbereitende, präparative, hardware- oder softwarebasierte Ansätze, machen unterschiedliche Dinge deutlich. Zum einen besteht noch Potential, um Verbesserungen bei der Untersuchung biologischer Proben zu erzielen, zum anderen wird aber auch die Komplexität solcher Untersuchungen verdeutlicht. Das Ziel, lateral hochaufgelöst kleinste Probenmengen, also Mengen deutlich unterhalb der Konzentration von Membranlipiden, massenspektrometrisch untersuchen zu können, bedarf weiterer Entwicklungen. Auch wenn die Verteilung präformierter Peptide oder von Peptiden, die durch tryptischen Verdau entstanden sind, bei Geweben bereits mehrfach durch unterschiedliche Arbeitsgruppen gezeigt wurde, bestehen dabei aber signifikante Unterschiede zu den dort verwendeten und dem hier beschriebenen AP-SMALDI Aufbau. Sei es beim Desorptions-Laserfokusbereich, dem Massenanalysator, bei der Anzahl der Laserpulse pro Probenposition oder dem Ansatz der Probenvorbereitung (Schwamborn et al., 2007; Minerva et al., 2008). Hinzu kommt, dass in anderen Arbeitsgruppen häufig neuronale



Gewebe untersucht werden, bei denen eine hohe Wahrscheinlichkeit präformierter Peptide besteht (Stoeckli et al., 2002; Chaurand et al., 2002; Kruse und Sweedler, 2003; Norris et al., 2007). Die Authentizität der Präparation, auch auf zellulärem Niveau, wurde explizit nur bei Agar et al. (2007) nachgewiesen. Bei Lemaire et al. (2006) wird dies zwar auch, aber äußerst unzureichend getan. Eine Ausnahme hinsichtlich des verwendeten Desorptions-Laserfokusdurchmessers sind Untersuchungen mit kommerziellen ToF-ToF Massenspektrometern der Firma Bruker Daltonics. Durch eine besondere Laseroptik (*smart beam*) werden auch hier Fokusdurchmesser von  $\approx 20\text{-}50\text{ }\mu\text{m}$ , als *flat top* ähnliches Laserprofil, erreicht (Holle et al., 2006). Einzig Taban et al. (2007) konnten Verteilungsmuster von Peptiden mit Hilfe eines FT-ICR MS darstellen. Dabei betrug die laterale Auflösung jedoch lediglich  $200\text{ }\mu\text{m}$  und es wurden 10 Laserpulse, zur Erstellung eines Massenspektrums summiert. Um tatsächlich unbekannte Komponenten durch Techniken wie CBS (Spengler, 2004) auf der Basis von Massenspektren mit hoher Massengenauigkeit und Massenauflösung untersuchen zu können, müssen die Ansprüche an die laterale Auflösung derzeit noch gesenkt werden. Dies ist bei Desorptions-Laserfokusdurchmessern  $<10\text{ }\mu\text{m}$ , mit der entwickelten und verwendeten AP-SMALDI Konfiguration, momentan noch nicht zu realisieren.

# Kapitel 6

## Anhang

### 6.1 Zellkultur

Tabelle 6.1: **Zusammensetzung fötaler Kälberseren**

Aus Lindl (2002), Tabelle 4-2, Seite 82.

Inhaltsstoffe	Durchschnittlicher Gehalt	Streuung	Proben
Endotoxin	0,356 ng/ml	0,008-10,0	39
Hämoglobin	11,3 mg/dl	2,4-18,1	17
Glucose	125 mg/100 ml	85-247	43
Natrium (Na)	137 meq/l	125-143	43
Kalium (K)	11,2 meq/l	10,0-14,0	43
Chlorid (Cl)	103 meq/l	98-108	43
Stickstoff (Blutharnstoff)	16 mg/100 ml	14-20	43
Gesamtprotein	3,8 g/100 ml	3,2-7,0	43
Albumin	2,3 g/100 ml	2,0-3,6	43
Calcium (Ca)	13,5 mg/100 ml	12,6-14,3	43
Anorg. Phosphor	9,8 mg/100 ml	4,3-11,4	43
Cholesterin	31 mg/100 ml	12-63	43
Harnsäure	2,9 mg/100 ml	1,3-4,1	43
Kreatinin	3,1 mg/100 ml	1,6-4,3	43
Gesamt-Bilirubin	0,4 mg/100 ml	0,3-1,1	43
Direktes Bilirubin	0,2 mg/100 ml	0,0-0,5	43
Alkalische Phosphatase	255 mU/ml	111-352	43
Lactatdehydrogenase	864 mU/ml	260-1215	43
Glutamat-Oxalacetat-	130 mU/ml	20-201	43

Transaminase 340			
Selen	0,026 $\mu\text{g/ml}$	0,014-0,038	25
Cortison	0,05 $\mu\text{g/100 ml}$	<0,1-2,3	43
Insulin	10 $\mu\text{U/ml}$	6-14	40
Paratyroid	1718 $\text{pg/ml}$	85-6180	41
Progesteron	8 $\text{ng/100 ml}$	<0,3-36	42
T3	119 $\text{ng/100 ml}$	56-223	41
T4	12,1 $\text{ng/100 ml}$	7,8-15,6	42
Testosteron	40 $\text{ng/100 ml}$	21-99	42
Prostaglandin E	5,91 $\text{ng/ml}$	0,5-30,48	37
Prostaglandin F	12,33 $\text{ng/ml}$	3,77-42,00	38
TSH	1,22 $\text{ng/ml}$	<0,2-4,5	40
FSH	9,5 $\text{ng/ml}$	<2-33,8	34
Wachstumshormon	39,0 $\text{ng/ml}$	18,7-51,6	40
Prolaktin	17,6 $\text{ng/ml}$	2,00-49,55	40
LTH	0,79 $\text{ng/ml}$	0,12-1,8	38
Vitamin A	9 $\mu\text{g/100 ml}$	<1-35	16
Vitamin E	0,11 $\text{mg/100 ml}$	<0,1-0,42	16
pH	7,40	7,20-7,60	40

## 6.2 Chemikalienliste

Tabelle 6.2: Chemikalienliste

Reagenz	Reinheitsgrad	Hersteller	Bestellnummer
Aceton	Uvasol	Merck	1000222500
Angiotensin II SLC: DRVYIHPF		Bachem	H-1705
Bradykinin 1-7 (Acetat) SLC: RPPGFSP		Bachem	H-1955
Cholesterin	>99%	Sigma-Aldrich	C8667
2,5-Dihydroxy- benzoesäure (2,5-DHB	puriss. 99%	Fluka	37550
DPBS		PAA Marburg	H15-002
Ethanol	Uvasol	Merck	1009802500
FBS (=FCS)	FBS Gold	PAA Laboratories	A11-151
HCl (Chlorwasserstoff- säure)	ACS	Sigma-Aldrich	320331-500ML
NH <sub>3</sub> , 25%	Suprapur	Merck	1054280250
NH <sub>4</sub> Cl	Suprapur	Merck	1011430050
D-Mannitol	ACS	Fluka	63560
Methanol	99,93%	Sigma Aldrich	494437
Peptid K SLC: HVQDLDMNL		Panatecs	
Peptid Q (Anti-inflammatory- Peptide) SLC: HDMNKVLDL	>97%	Bachem	H-9440
Phosphatidylcholin 34:1 (1-Oleoyl- 2-palmitoyl- sn-glycero-3- phosphocholin)	>98%	Sigma-Aldrich	P4142
Trichloressigsäure	>99%	Sigma Aldrich	T6399
Tris-Base		Fluka	T4661-1KG
Trypsin-EDTA		PAA Marburg	L11-004

### 6.3 Herstellerliste

Tabelle 6.3: Herstellerliste

Hersteller/Vertrieb	Firmensitz/Bestelllager	URL Adresse
Carl Roth GmbH+C..KG	Schoemperlenstr. 3-5 76185 Karlsruhe Deutschland	<a href="http://www.carl-roth.de">www.carl-roth.de</a>
Carl Zeiss AG	Carl-Zeiss-Str. 22, Oberkochen, Deutschland	<a href="http://www.zeiss.de">www.zeiss.de</a>
Coherent GmbH	Dieselstraße 5 b 64807 Dieburg Deutschland	<a href="http://www.coherent.de">www.coherent.de</a>
Cohu Inc., Eletronics Division	San Diego, CA, USA	<a href="http://www.cohu-cameras.com">www.cohu-cameras.com</a>
Farnell GmbH	Keltenring 14 82041 Oberhaching Deutschland	<a href="http://de.farnell.com">http://de.farnell.com</a>
ficonTEC GmbH	Fahrenheitsstr. 9, 28359 Bremen Deutschland	<a href="http://www.ficontec.com">www.ficontec.com</a>
DSMZ, Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH	Inhoffenstraße 7 B 38124 Braunschweig Deutschland	<a href="http://www.dsmz.de">www.dsmz.de</a>
Fluka Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Riedstraße 2 8955 Steinheim Deutschland	<a href="http://www.sigmaaldrich.com">www.sigmaaldrich.com</a>
FuG Elektronik GmbH	Florianstr. 2 83024 Rosenheim Deutschland	<a href="http://www.fug-elektronik.de">www.fug-elektronik.de</a>
Gierich GmbH	Moselstr. 18 41464 Neuss Deutschland	<a href="http://www.gierich-gmbh.de">www.gierich-gmbh.de</a>
Gonotec GmbH	GSG-Hof Reuchlinstr.10-11 10553 Berlin Deutschland	<a href="http://www.gonotec.com">www.gonotec.com</a>
Harry Rieck Edelstahl GmbH	Weststraße 59-61 40721 Hilden	<a href="http://www.riek-edelstahl.de">www.riek-edelstahl.de</a>

	Deutschland	
Helmut Hund GmbH	Wilhelm-Will-Str. 7 35580 Wetzlar Deutschland	<a href="http://www.hund.de">www.hund.de</a>
Hettich Lab Technology Andreas Hettich GmbH&Co.KG	Föhrenstr. 12 78532 Tuttlingen Deutschland	<a href="http://www.hettichlab.com">www.hettichlab.com</a>
Kojair Tech Oy	Teollisuustie 3 35700 Vilppula Finland	<a href="http://www.kojair.com">www.kojair.com</a>
Leica Microsystems GmbH	Ernst-Leitz-Strasse 17-37 35578 Wetzlar Deutschland	<a href="http://www.leica-microsystems.com">www.leica-microsystems.com</a>
Linos Photonics GmbH&Co.KG	Königsallee 23, 37070 Göttingen, Deutschland	<a href="http://www.linos.de">www.linos.de</a>
LO Laser Optik	Gneisenaustr. 14, 30826 Garbsen, Deutschland	<a href="http://www.laseroptik.de">www.laseroptik.de</a>
LONZA Group Ltd.	Muenchensteinerstrasse 38 4002 Basel Schweiz	<a href="http://www.lonza.com">www.lonza.com</a>
NAI Motion Control National Aperture Inc.	16 Northwestern Drive Salem, NH, USA	<a href="http://www.naimotion.com">www.naimotion.com</a>
NET GmbH	Lerchenberg 7, 86923 Finning, Deutschland	<a href="http://www.net-gmbh.com">www.net-gmbh.com</a>
National Instruments Deutschland GmbH	Konrad-Celtis-Str. 79 81369 München Deutschland	<a href="http://digital.ni.com/worldwide/germany.nsf">http://digital.ni.com/worldwide/germany.nsf</a>
Olympus Life Science Europa GmbH	Wendenstr. 14-18 20097 Hamburg Deutschland	<a href="http://www.olympus.de">www.olympus.de</a>
Olympus Soft Imaging Solutions GmbH	Johann-Krane-Weg 39 48149 Münster Deutschland	<a href="http://www.soft-imaging.net">www.soft-imaging.net</a>
OWIS GmbH	Im Gaisgraben 7,	<a href="http://www.owis-staufen.de">www.owis-staufen.de</a>

	79219 Staufen, Deutschland	
PAA Laboratories GmbH	Unterm Bornrain 2, 35091 Cölbe, Deutschland	www.paa.com
PANATecs GmbH	Vor dem Kreuzberg 17 72070 Tübingen Deutschland	www.panatecs.com
PAN Biotech GmbH	Am Gewerbepark 13 94501 Aidenbach Deutschland	www.pan-biotech.com
PLANO GmbH	Ernst-Befort-Strasse 12 35578 Wetzlar Deutschland	www.plano-em.de
Sakura Finetek Germany GmbH	Innere Neumatten 20 79219 Staufen Deutschland	www.sakuraeu.com
SANYO E&E Europe BV	9 The Office Village North Road Loughborough Leicestershire, LE11 1QJ Großbritannien	www.sanyo- biomedical.co.uk
Schott Glas	Hattenbergstraße 10 551223 Mainz Deutschland	www.schott.de
Serva Electrophoresis GmbH	Carl-Benz-Str. 7 69115 Heidelberg Deutschland	www.serva.de
Shimadzu Europe GmbH	Albert-Hahn-Str. 6-10 47269 Duisburg Deutschland	www.shimadzu.de
Sony Deutschland GmbH	Kemperplatz 1 10785 Berlin Deutschland	www.sony.de
Spiricon GmbH	An der Strusbek 60-62, 22926 Ahrensburg, Deutschland	www.spiricon.de
S&H Scientific		

Instruments

Linden  
Deutschland



# Literaturverzeichnis

- Agar, N. Y. R., H. W. Yang, R. S. Carroll, P. M. Black und J. N. Agar, 2007. Matrix solution fixation: Histology-compatible tissue preparation for MALDI mass spectrometry imaging. *Analytical Chemistry*, **79**, 7416–7423.
- Allwood, D. A., P. E. Dyer und R. W. Dreyfus, 1997. Ionization modelling of matrix molecules in ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **11**, 499–503.
- Amoresano, A., A. Carpentieri, C. Giangrande, A. Palmese, G. Chiappetta, G. Marino und P. Pucci, 2009. Technical advances in proteomics mass spectrometry: identification of post-translational modifications. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, **47**, 647–665.
- Amoruso, S., R. Bruzzese, N. Spinelli und R. Velotta, 1999. Characterization of laser-ablation plasmas. *Journal of Physics B: Atomic, Molecular and Optical Physics*, **32**, R131–R172.
- Armstrong, D. W., L.-K. Zhang, L. He und M. L. Gross, 2001. Ionic liquids as matrixes for Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **73**, 3679–3686.
- Arne Leisner, 2005. *Mirion 1.0 – kick start manual*. Giessen, Germany, 1. Aufl.
- Balashev, K., N. J. DiNardo, T. H. Callisen, A. Svendsen und T. Bjørnholm, 2007. Atomic force microscope visualization of lipid bilayer degradation due to action of phospholipase A<sub>2</sub> and *Humicola lanuginosa* lipase. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*, **1768**, 90–99.
- Barber, M., R. S. Bordoli, R. D. Sedgwick und A. N. Tyler, 1981. Fast atom bombardment of solids (F.A.B.): a new ion source for mass spectrometry. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, S. 325–327.
- Beavis, R. C. und J. N. Bridson, 1993. Epitaxial protein inclusion in sinapic acid crystals. *Journal of Physics D: Applied Physics*, **26**, 442–447.

- Beavis, R. C., T. Chaudhary und B. T. Chait, 1992.  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid as a matrix for matrix assisted laser desorption mass-spectrometry. *Organic Mass Spectrometry*, **27**, 156–158.
- Beavis, R. C., J. Lindner, J. Grotemeyer und E. Schlag, 1988. Sample-matrix effects in infrared laser neutral desorption, multiphoton-ionization mass spectrometry. *Chemical Physics Letters*, **146**, 310–314.
- Beck, E. H., S. Fettig, C. Knake, K. Hartig und T. Bhattarai, 2007. Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. *Journal of Bioscience*, **32**, 501–510.
- Beckey, H.-D., 1963. Field ionization mass spectrometry. *Advances in Mass Spectrometry*, **2**, 1–24.
- Beckey, H.-D., 1969. Field desorption mass spectrometry: A technique for the study of thermally unstable substances of low volatility. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics*, **2**, 500–502.
- Bereiter-Hahn, J., M. Luck, T. Miebach, H. K. Stelzer und M. Vöth, 1990. Spreading of trypsinized cells: cytoskeletal dynamics and energy requirements. *Journal of Cell Science*, **96**, 171–188.
- Berkel, G. J. V., 2003. An overview of some recent developments in ionization methods for mass spectrometry. *European Journal of Mass Spectrometry*, **9**, 539–562.
- Berkenkamp, S., C. Menzel, F. Hillenkamp und K. Dreisewerd, 2002. Measurements of mean initial velocities of analyte and matrix ions in infrared matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **13**, 209–220.
- Bökelmann, V., B. Spengler und R. Kaufmann, 1995. Dynamical parameters of ion ejection and ion formation in matrix-assisted laser desorption/ionization. *European Journal of Mass Spectrometry*, **1**, 81–93.
- Bouschen, W. und B. Spengler, 2007. Artifacts of MALDI sample preparation investigated by high-resolution scanning microprobe matrix-assisted laser desorption/ionization (SMALDI) imaging mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, **266**, 129–137.
- Bouschen, W. S., 2004. *Ortsaufgelöste MALDI-Massenspektrometrie an biologischen und synthetischen Oberflächen*. Dissertation, Justus-Liebig-Universität, <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2004/1526/>.

- Brügger, B., G. Erben, R. Sandhoff, F. T. Wieland und W. D. Lehmann, 1997. Quantitative analysis of biological membrane lipids at the low picomole level by nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**, 2339–2344.
- Bruins, A. P., 1991. Mass spectrometry with ion sources operating at atmospheric pressure. *Mass Spectrometry Reviews*, **10**, 53–77.
- Castoro, J. A. und C. L. Wilkins, 1993. Ultrahigh resolution matrix-assisted laser desorption ionization of small proteins by fourier transform mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **65**, 2621–2637.
- Chaurand, P., S. A. Schwartz und R. M. Caprioli, 2002. Imaging mass spectrometry: a new tool to investigate the spatial organization of peptides and proteins in mammalian tissue sections. *Current Opinion in Chemical Biology*, **6**, 676–681.
- Chen, Y., J. Allegood, Y. Liu, E. Wang, B. na, Cachón-González, T. M. Cox, J. Alfred H. Merrill und M. C. Sullards, 2008. Imaging MALDI mass spectrometry using an oscillating capillary nebulizer matrix coating system and its application to analysis of lipids in brain from a mouse model of Tay-Sachs/Sandhoff disease. *Analytical Chemistry*, **80**, 2780–2788.
- Chilom, G., O. Chilom und J. A. Rice, 2008. Exploring the high-mass components of humic acid by laser desorption ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **12**, 1528–1532.
- Cilia, M. L. und D. Jackson, 2004. Plasmodesmata form and function. *Current Opinion in Cell Biology*, **16**, 500–506.
- Cliffe, S. G. R. und david A. W. Grant, 1981. Calcium-binding constants of trypsin and trypsinogen. *Biochemical Journal*, **193**, 655–658.
- Cohen, S. L. und B. T. Chait, 1996. Influence of matrix solution conditions on the MALDI-MS analysis of peptides and proteins. *Analytical Chemistry*, **68**, 31–37.
- Coherent Inc., 2005. *FieldMaxII-Top User Manual*. Coherent Inc., Santa Clara, CA 95054, USA, 6/2005 Aufl.
- Comisarow, M. B., 1985. Fundamental aspects and applications of fourier-transform ion-cyclotron resonance spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, **178**, 1–15.

- Comisarow, M. B. und A. G. Marshall, 1974. Fourier transform ion cyclotron resonance spectrometry. *Chemical Physics Letters*, **25**, 282–283.
- Cramer, R. und S. Corless, 2005. Liquid ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for automated proteomic analysis. *Proteomics*, **5**, 360–370.
- Dang, S. M., M. Kyba, R. Perlingeiro, G. Q. Daley und P. W. Zandstra, 2001. Efficiency of embryoid body formation and hematopoietic development from embryonic stem cells in different culture systems. *Biotechnology and Bioengineering*, **78**, 442–453.
- Dashtiev, M., V. Frankevich und R. Zenobi, 2006. Kinetic energy of free electrons affects MALDI positive ion yield via capture cross-section. *Journal of Physical Chemistry A*, **110**, 926–930.
- de la Barca, A. M. C., R. Ruiz-Salazar und M. Jara-Marini, 2000. Enzymatic hydrolysis and synthesis of soy protein to improve its amino acid composition and functional properties. *Journal of Food Science*, **65**, 246–253.
- Demtröder, W., 2008. *Experimentalphysik 2 – Elektrizität und Optik*. Springer Verlag, 5. Aufl.
- Dingus, R. S. und R. J. Scammon, 1991. Grüneisen-stress-induced ablation of biological tissue. *Proceedings of SPIE*, **1427**, 45.
- Donovan, R. J., 1979. Reactive, inelastic and radiative processes involving electronically excited atoms. *Progress in Reaction Kinetics*, **10**, 253–299.
- Doroshenko, V. M., V. V. Laiko, N. I. Taranenko, V. D. Berkout und H. S. Lee, 2002. Recent developments in atmospheric pressure MALDI mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, **221**, 39–51.
- Douglas, D. J., 2009. Linear quadrupoles in mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, **28**, 937–960.
- Douglas, D. J., A. J. Frank und D. Mao, 2005. Linear ion traps in mass spectrometry. *Reviews in Mass Spectrometry*, **24**, 1–29.
- Drakoudis, A., M. Söllner und G. Werth, 2006. Instabilities of ion motion in a linear paul trap. *International Journal of Mass Spectrometry*, **252**, 61–68.
- Dreisewerd, K., 2003. The desorption process in MALDI. *Chemical Reviews*, **103**, 395–425.

- Dreisewerd, K., M. Schürenberg, M. Karas und F. Hillenkamp, 1995. Influence of the laser intensity and spot size on the desorption of molecules and ions in matrix-assisted laser desorption/ionization with a uniform beam profile. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, **141**, 127–148.
- Ehring, H., M. Karas und F. Hillenkamp, 1992. Role of photoionization and photochemistry in ionization processes of organic molecules and relevance for matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Organic Mass Spectrometry*, **27**, 472–480.
- Eilers, M., A. B. Patel, W. Liu und S. O. Smith, 2002. Comparison of helix interactions in membrane and soluble  $\alpha$ -bundle proteins. *Biophysical Journal*, **82**, 2720–2736.
- Emmert-Buck, M. R., J. W. Gillespie, C. P. Paweletz, D. K. Ornstein, V. Basrur, E. Appella, Q.-H. Wang, J. Huang, N. Hu, P. Taylor und E. F. Petricoin, 2000. An approach to proteomic analysis of human tumors. *Molecular Carcinogenesis*, **27**, 158–165.
- Fadnavis, N. W., R. L. Babu und A. Deshpande, 1998. Reactivity of trypsin in reverse micelles: pH-effects on the  $W_0$  versus enzyme activity profiles. *Biochimie*, **80**, 1025–1030.
- Falkner, E., H. Appl, C. Eder, U. Losert, H. Schöffl und W. Pfaller, 2006. Serum free cell culture: The free access online database. *Toxicology in vitro*, **20**, 395–400.
- Fan, K.-C., C.-L. Chu, J.-L. Liao und J.-I. Mou, 2003. Development of a high-precision straightness measuring system with DVD pick-up head. *Measuring Science and Technology*, **14**, 47–54.
- Fan, K. C., C. Y. Lin und L. H. Shyu, 2000. The development of a low-cost focusing probe for profile measurement. *Measuring Science and Technology*, **11**, N1–N7.
- Feigl, P. K. D., F. R. Krueger und B. Schueler, 1984. Determination of organic and inorganic compounds in the femtogram range by laser microprobe mass spectrometry. *Mikrochimica Acta*, **2**, 85–96.
- Feng, X., X. Liu, Q. Luo und B.-F. Liu, 2008. Mass spectrometry in systems biology: An overview. *Mass Spectrometry Reviews*, **27**, 635–660.

- Fettiplace, R., D. M. Andrews und D. A. Haydon, 1971. The thickness, composition and structure of some lipid bilayers and natural membranes. *Journal of Membrane Biology*, **5**, 277–296.
- ficonTEC alignment solutions GmbH, 2003. *MM-3M-F XYZ-Koordinaten System mit Achskontroller NI-PCI 7344, Achsverstärker NAI MC-4SA und Steuerersoftware*. Fahrenheitsstr. 1, 28359 Bremen, Germany, 1.1 Aufl.
- Finehout, E. J., J. R. Cantor und K. H. Lee, 2005. Kinetic characterization of sequencing grade modified trypsin. *Proteomics*, **5**, 2319–2321.
- Fink, L., G. Kwapiszewska, J. Wilhelm und R. M. Bohle, 2006. Laser-microdissection for cell type- and compartment-specific analyses on genomic and proteomic level. *Experimental and Toxicologic Pathology*, **57**, 25–29.
- Fournier, I., A. Brunot, J. Tabet und G. Bolbach, 2002. Delayed extraction experiments using a repulsive potential before ion extraction: Evidence of clusters as ion precursors in UV-MALDI. part 1: Dynamical effects with the matrix 2,5-dihydroxybenzoic acid. *International Journal of Mass Spectrometry*, **213**, 203–215.
- Fournier, I., A. Brunot, J. C. Tabet und G. Bolbach, 2005. Delayed extraction experiments using a repulsing potential before ion extraction: evidence of non-covalent clusters as ion precursor in UV matrix-assisted laser desorption/ionization. part 2-dynamic effects with  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix. *Journal of Mass Spectrometry*, **40**, 50–59.
- Fournier, I., C. Marinach, J. C. Tabet und G. Bolbach, 2003. Irradiation effects in MALDI, ablation, ion production, and surface modifications. part ii: 2,5-dihydroxybenzoic acid monocrystals. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **14**, 893–899.
- Frankevich, V., R. Knochenmuss und R. Zenobi, 2002. The origin of electrons in MALDI and their use for sympathetic cooling of negative ions in FTICR. *International Journal of Mass Spectrometry*, **220**, 11–19.
- Frankevich, V. E., J. Zhang, S. D. Friess, M. Dashtiev und R. Zenobi, 2003. Role of electrons in laser desorption/ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **75**, 6063–6067.
- Fricker, M., J. Runions und I. Moore, 2006. Quantitative fluorescence microscopy: From art to science. *Annual Review of Plant Biology*, **57**, 79–107.

- Gamito-Santos, J., L. Gómez, R. Calero-Bernal, J. Rol-Díaz, L. González-Ruibal, M. Gómez-Blázquez und J. Pérez-Martín, 2009. Histopathology of trichinellosis in wild boar. *Veterinary Parasitology*, **165**, 165–169.
- Garrett, T. J. und R. A. Yost, 2006. Analysis of intact tissue by intermediate-pressure MALDI on a linear ion trap mass spectrometer. *Analytical Chemistry*, **78**, 2465–2469.
- Gibson, J. K., R. G. Haire, J. Marçalo, M. Santos, J. P. Leal, A. P. de Matos, R. Tyagi, M. K. Mrozik, R. M. Pitzer und B. E. Bursten, 2007. FTICR/MS studies of gas-phase actinide ion reactions: fundamental chemical and physical properties of atomic and molecular actinide ions and neutrals. *The European Physical Journal D*, **45**, 133–138.
- Glückmann, M. und M. Karas, 1999. The initial ion velocity and its dependence on matrix, analyte and preparation method in ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization. *Journal of Mass Spectrometry*, **34**, 467–477.
- Günther, S., 2007. *Charakterisierung laseroptischer Parameter bei der Scanning Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Massenspektrometrie (SMALDI-MS)*. Diplomarbeit, Justus-Liebig-Universität.
- Gounaris, K., V. P. Smith und M. E. Selkirk, 1996. Structural organisation and lipid composition of the epicuticular accessory layer of infective larvae of *Trichinella spiralis*. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*, **1281**, 91–100.
- Grigoren, G., R. I. Carey und I. J. Amster, 1996. Studies of exchangeable protons in the matrix-assisted laser desorption/ionization process. *European Journal of Mass Spectrometry*, **2**, 139–143.
- Groseclose, M. R., M. Andersson, W. M. Hardesty und R. M. Caprioli, 2007. Identification of proteins directly from tissue: *in situ* tryptic digestions coupled with imaging mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, **42**, 254–262.
- Guan, S. und A. G. Marshall, 1995. Ion traps for fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: principles and design of geometric and electric configurations. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, **146/147**, 261–296.
- Guenther, S., M. Koestler, O. Schulz und B. Spengler, 2010. Laser spot size and laser power dependence of ion formation in high resolution MALDI imaging. *International Journal of Mass Spectrometry*, **294**, 7–15.

- Haase, R., M. Unthan, P. Couturier, A. Radunz und G. H. Schmid, 1993. Determination of glycolipids, sulfolipid and phospholipids in the thylakoid membrane. *Zeitschrift für Naturforschung C*, **48c**, 623–631.
- Hankin, S. M. und P. John, 1999. Microscopic cluster formation during the laser desorption of chrysene-d<sub>12</sub>. *Journal of Physical Chemistry B*, **103**, 4566–4569.
- Hare, P. D., W. A. Cress und J. van Staden, 1998. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell and Environment*, **21**, 535–553.
- Hars, G., 2001. The concept of the helical dipole conduit and its applications. *Vacuum*, **61**.
- Hars, G. und H. L. C. Meuzelaar, 1997. Flexible ion conduit for use under rarefied atmospheric conditions. *The Review of Scientific Instruments*, **68**, 3351–3356.
- Hergenröder, R., O. Samek und V. Hommes, 2006. Femtosecond laser ablation elemental mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, **25**, 551–572.
- Hester, A., W. Bouschen, A. Leisner, K. Maass, C. Paschke und B. Spengler, 2005. Mirion-A data analysis software package for imaging MS. In *Proceedings of the 53rd Annual Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*. San Antonio, Texas, USA.
- Hillenkamp, F., E. Unsöld, R. Kaufmann und R. Nitsche, 1975. Laser microprobe mass analysis of organic materials. *Nature*, **256**, 119–120.
- Holle, A., A. Haase, M. Kayser und J. Höhndorf, 2006. Optimizing UV laser focus profiles for improved MALDI performance. *Journal of Mass Spectrometry*, **41**, 705–716.
- Horneffer, V., K. Strupat und F. Hillenkamp, 2006. Localization of noncovalent complexes in MALDI-preparations by CLSM. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **17**, 1599–1604.
- Itoh, J., K. Kawai, A. Serizawa, Y. Yamamoto, K. Ogawa, A. Matsuno, K. Watanabe und R. Y. Osamura, 2001. Three-dimensional imaging of hormone-secreting cells and their microvessel environment in estrogen-induced prolactinoma of the rat pituitary gland by confocal laser scanning microscopy. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, **9**, 364–370.



- Jaskolla, T. W. und M. Karas, 2008. Using fluorescence dyes as a tool for analyzing the MALDI process. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **19**, 1054–1061.
- Johnson, R. E. und B. U. R. Sundvist, 1991. Laser-pulse ejection of organic molecules from a matrix: Lessons from fast-ion-induced ejection. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **5**, 574–578.
- Jouston, K. und M. Wutz, 2006. *Wutz Handbuch der Vakuumtechnik. Theorie und Praxis*. Vieweg Verlag, Wiesbaden, 9. Aufl.
- Juhasz, P., M. L. Vestal und S. A. Martin, 1997. On the initial velocity of ions generated by matrix-assisted laser desorption ionization and its effect on the calibration of delayed extraction time-of-flight mass spectra. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **8**, 209–217.
- Jurchen, J. C., S. S. Rubakhin und J. V. Sweedler, 2005. MALDI-MS imaging of features smaller than the size of the laser beam. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **16**, 1654–1659.
- Karas, M., D. Bachmann und F. Hillenkamp, 1985. Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules. *Analytical Chemistry*, **57**, 2935–2939.
- Karas, M., U. Bahr, I. Fournier, M. Glückmann und A. Pfenninger, 2003. The initial-ion velocity as a marker for different desorption-ionization mechanisms in MALDI. *International Journal of Mass Spectrometry*, **226**, 239–248.
- Karas, M., U. Bahr, K. Strupat, F. Hillenkamp, A. Tsarhpoulos und B. N. Pramanik, 1995. Matrix dependence of metastable fragmentation of glycoproteins in MALDI TOF mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **67**, 675–679.
- Karas, M., M. Glückmann und J. Schäfer, 2000. Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors. *Journal of Mass Spectrometry*, **35**, 1–12.
- Karas, M. und F. Hillenkamp, 1988. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 daltons. *Analytical Chemistry*, **60**, 2299–2301.
- Karas, M. und R. Krüger, 2003. Ion formation in MALDI: The cluster ionization mechanism. *Chemical Reviews*, **103**, 427–439.

- Karbach, V. und R. Knochenmuss, 1998. Do single matrix molecules generate primary ions in ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **12**, 968–974.
- Kellersberger, K. A., P. V. Tan, V. V. Laiko, V. M. Doroshenko und D. Fabris, 2004. Atmospheric pressure MALDI-fourier transform mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **76**, 3930–3934.
- Khalil, A. A., S. S. Mohamed, F. S. Taha und E. N. Karlsson, 2006. Production of functional protein hydrolysates from egyptian breeds of soybean and lupin seeds. *African Journal of Biotechnology*, **5**, 907–916.
- Khatib-Shahidi, S., M. Andersson, J. L. Herman, T. A. Gillespie und R. M. Caprioli, 2006. Direct molecular analysis of whole-body animal tissue sections by imaging MALDI mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **78**, 6448–6456.
- Kim, B.-S., Y. H. Choi, C. Y. Choi und B. G. Kim, 1992. Mammalian cell cultivation on serum-coated microcarriers. *Biotechnology Techniques*, **6**, 347–352.
- Kinsel, G. R., M. E. Gimon-Kinsel, K. J. Gillig und D. H. Russell, 1999. Investigation of the dynamics of matrix-assisted laser desorption/ionization ion formation using an electrostatic analyzer/time-of-flight mass spectrometer. *Journal of Mass Spectrometry*, **34**, 684–690.
- Knochenmuss, R., 2004. Photoionization pathways and free electrons in UV-MALDI. *Analytical Chemistry*, **76**, 3179–3184.
- Knochenmuss, R., 2006. Ion formation mechanisms in UV-MALDI. *The Analyst*, **131**, 966–986.
- Knochenmuss, R., A. Stortelder, K. Breuker und R. Zenobi, 2000. Secondary ionmolecule reactions in matrix-assisted laser desorption/ionization. *Journal of Mass Spectrometry*, **35**, 1237–1245.
- Knochenmuss, R. und R. Zenobi, 2003. MALDI ionization: The role of in-plume processes. *Chemical Reviews*, **103**, 441–452.
- Koubenakis, A., V. Frankevich, J. Zhang und R. Zenobi, 2004. Time-resolved surface temperature measurement of maldi matrices under pulsed uv laser irradiation. *Journal of Physical Chemistry A*, **108**, 2405–2410.
- Kranenburg, M. und B. Smit, 2004. Simulating the effect of alcohol on the structure of a membrane. *FEBS Letters*, **568**, 15–18.

- Krüger, R., A. Pfenninger, I. Fournier, M. Glückmann und M. Karas, 2001. Analyte incorporation and ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization visualized by pH indicator molecular probes. *Analytical Chemistry*, **73**, 5812–5821.
- Kruse, R. und J. V. Sweedler, 2003. Spatial profiling invertebrate ganglia using MALDI MS. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **14**, 752–759.
- Krutchinsky, A. N. und B. T. Chait, 2002. On the nature of the chemical noise in MALDI mass spectra. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **13**, 129–134.
- Köstler, M., 2003. *Untersuchungen zum Phänomen der Kälteakklimatisierung an den Weizenvarianten (Triticum aestivum L.) Albidum und Bezostaja anhand morphologischer und physiologischer Parameter*. Diplomarbeit, Justus-Liebig-Universität.
- Kwapiszewska, G., M. Meyer, R. Bogumil, R. M. Bohle, W. Seeger, N. Weissmann und L. Fink, 2004. Identification of proteins in laser-microdissected small cell numbers by SELDI-TOF and tandem MS. *BioMed Central*, **4**.
- Laiko, V. V., M. A. Baldwin und A. L. Burlingame, 2000a. Atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **72**, 652–657.
- Laiko, V. V., S. C. Moyer und R. J. Cotter, 2000b. Atmospheric pressure MALDI/Ion Trap mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **72**, 5239–5243.
- Lawrence, E. O. und M. S. Livingston, 1932. The production of high speed light ions without the use of high voltages. *Physical Review A*, **40**, 19–37.
- Lehmann, E., R. Knochenmuss und R. Zenobi, 1997. Ionization mechanisms in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: Contribution of pre-formed ions. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **11**, 1483–1492.
- Lehmann, W. D., A. Böhne und C.-W. von der Lieth, 2000. The information encrypted in accurate peptide masses – improved protein identification and assistance in glycopeptide identification and characterization. *Journal of Mass Spectrometry*, **35**, 1335–1341.

- Lemaire, R., J. C. Tabet, P. Ducoroy, J. B. Hendra, M. Salzet und I. Fournier, 2006. Solid ionic matrixes for direct tissue analysis and MALDI imaging. *Analytical Chemistry*, **78**, 809–819.
- Leonard, S. S., K. Mowrey, D. Pack, X. S. V. Castranova, P. Kuppusamy und V. Vallyathan, 2002. *In vivo* bioassays of acute asbestosis and its correlation with esr spectroscopy and imaging in redox status. *Molecular and Cellular Biochemistry*, **234/235**, 369–377.
- Li, Y. L., M. L. Gross und F.-F. Hsu, 2005. Ionic-liquid matrices for improved analysis of phospholipids by MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **16**, 679–682.
- Liao, P.-C. und J. Allison, 1995. Ionization processes in matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: Matrix-dependent formation of  $[M + H]^+$  vs.  $[M + Na]^+$  ions of small peptides and some mechanistic comments. *Journal of Mass Spectrometry*, **30**, 408–423.
- Lindl, T., 2002. *Zell- und Gewebekultur: Einführung in die Grundlagen sowie ausgewählte Methoden und Anwendungen*. Spektrum-Akademischer Verlag, 5. Aufl.
- Liu, M., L. L. Parker, B. E. Wadzinski und B.-H. Shieh, 2000. Reversible phosphorylation of the signal transduction complex in drosophila photoreceptors. *The Journal of Biological Chemistry*, **275**, 12194–12199.
- Loboda, A. V. und I. V. Chernushevich, 2005. Investigation of the mechanism of matrix adduct formation in MALDI at elevated pressure. *International Journal of Mass Spectrometry*, **240**.
- Lottspeich, F. und H. Zorbas, 1998. *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, 1. Aufl.
- Luxembourg, S. L., T. H. Mize, L. A. McDonnell und R. M. A. Heeren, 2004. High-spatial resolution mass spectrometric imaging of peptide and protein distributions on a surface. *Analytical Chemistry*, **76**, 5339–5344.
- Mantini, D., F. Petrucci, D. Pieragostino, P. D. Boccio, M. D. Nicola, C. D. Ilio, G. Federici, P. Sacchetta, S. Comani und A. Urbani, 2007. LIMPIC: a computational method for the separation of protein MALDI-TOF-MS signals from noise. *BMC Bioinformatics*, **8**, 1–17.
- March, R. E., 2009. Quadrupole ion traps. *Mass Spectrometry Reviews*, **28**, 961–989.

- Margetic, V., A. Pakulev, A. Stockhaus, M. Bolshov, K. Niemax und R. Hergenröder, 2000. A comparison of nanosecond and femtosecond laser-induced plasma spectroscopy of brass samples. *Spectrochimica Acta B*, **55**, 1771–1785.
- Marshall, A. G., C. L. Hendrickson und G. S. Jackson, 1998. Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry: A primer. *Mass Spectrometry Reviews*, **17**, 1–35.
- Martin, R. M., H. Leonhardt und M. C. Cardoso, 2005. DNA labeling in living cells. *Cytometry Part A*, **67A**, 45–52.
- Martínez, M. J., M. L. Hernández, M. Lacort und B. Ochoa, 1994. Regulation of rat liver microsomal cholesterol ester hydrolase by reversible phosphorylation. *Lipids*, **29**, 7–13.
- McCombie, G. und R. Knochenmuss, 2006. Enhanced MALDI ionization efficiency at the metal-matrix interface: Practical and mechanistic consequences of sample thickness and preparation method. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **17**, 737–745.
- Minerva, L., S. Clerens, G. Baggerman und L. Arckens, 2008. Direct profiling and identification of peptide expression differences in the pancreas of control and ob/ob mice by imaging mass spectrometry. *Proteomics*, **8**, 3763–3774.
- Miotello, A. und R. Kelly, 1999. Laser-induced phase explosion: new physical problems when a condensed phase approaches the thermodynamic critical temperature. *Applied Physics A*, **69**, 67–73.
- Moini, M., 1994. Ultramark 1621 as a calibration/reference compound for mass spectrometry. ii. positive- and negative-ion electrospray ionization. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **8**, 711–714.
- Moloney, M., L. McDonnell und H. O'Shea, 2004. Atomic force microscopy of BHK-21 cells: an investigation of cell fixation techniques. *Ultramicroscopy*, **100**, 153–161.
- Morelle, W., 2009. Analysis of glycosylation and other post-translational modifications by mass spectrometry. *Current Analytical Chemistry*, **5**, 144–165.
- Moyer, S. C., B. A. Budnik, J. L. Pittman, C. E. Costello und P. B. O'Connor, 2003. Attomole peptide analysis by high-pressure matrix-assisted laser desorption/ionization fourier transform mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **75**, 6449–6454.

- Nelson, R. W. und T. W. Hutchins, 1992. Mass spectrometric analysis of a transition-metal-binding peptide using matrix-assisted laser-desorption time-of-flight mass spectrometry. a demonstration of probe tip chemistry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **6**, 4–8.
- Nemethova, M., S. Auinger und J. V. Small, 2008. Building the actin cytoskeleton: filopodia contribute to the construction of contractile bundles in the lamella. *The Journal of Cell Biology*, **180**, 1233–1244.
- Norris, J. L., D. S. Cornett, J. A. Mobley, M. Andersson, E. H. Seeley, P. Chaurand und R. M. Caprioli, 2007. Processing MALDI mass spectra to improve mass spectral direct tissue analysis. *International Journal of Mass Spectrometry*, **260**, 212–221.
- O'Connor, P. B. und C. E. Costello, 2001. A high pressure matrix-assisted laser desorption/ionization fourier transform mass spectrometry ion source for thermal stabilization of labile biomolecules. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **15**, 1862–1868.
- Ogorzalek-Loo, R. R. und J. A. Loo, 2007. Matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry of hydrophobic proteins in mixtures using formic acid, perfluorooctanoic acid, and sorbitol. *Analytical Chemistry*, **79**, 1115–1125.
- Page, R. C., C. Li, J. Hu, F. P. Gao und T. A. Cross, 2007. Lipid bilayers: an essential environment for the understanding of membrane proteins. *Magnetic Resonance in Chemistry*, **45**, S2–S11.
- Papayannopoulos, I. A., 1995. The interpretation of collision-induced dissociation tandem mass spectra of peptides. *Mass Spectrometry Reviews*, **14**, 49–73.
- Paterson, S. J., K. W. Butler, P. Huang, J. Labelle, I. C. P. Smith und H. Schneider, 1972. The effects of alcohols on lipid bilayers: A spin label study. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*, **266**, 597–602.
- Paul, W., 1990. Electromagnetic traps for charges and neutral particles. *Reviews of Modern Physics*, **62**, 531–542.
- Paul, W. und H. Steinwedel, 1953. Ein neues massenspektrometer ohne magnetfeld. *Zeitschrift für Naturforschung A*, **8**, 448–450.
- Peterson, D. S., 2006. Matrix-free methods for laser desorption/ionization mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, **26**, 19–34.

- Pshenichnyuk, S. A. und N. L. Asfandiarov, 2004. The role of free electrons in matrix-assisted laser desorption/ionization: electron capture by molecules of  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid. *European Journal of Mass Spectrometry*, **10**, 477–486.
- Roberts, C., C. S. Chen, M. Mrksich, V. Martichonok, D. E. Ingber und G. M. Whitesides, 1998. Using mixed self-assembled monolayers presenting rgd and (eg)3oh groups to characterize long-term attachment of bovine capillary endothelial cells to surfaces. *Journal of the American Chemical Society*, **120**, 6548–6555.
- Roche Diagnostics GmbH, 2009. *Trypsin Sequencing Grade – from Bovine Pancreas*. Roche Applied Diagnostics, 68298 Mannheim, Germany, 0609 Aufl.
- Schakenraad, J., J. Arends, H. Busscher, F. Dijk, P. van Wachem und C. Wildevuur, 1987. Kinetics of cell spreading on protein precoated substrata: a study of interfacial aspects. *Biomaterials*, **10**, 43–50.
- Schäfer, K.-C., J. Dénes, K. Albrecht, T. Szaniszló, J. Balog, R. Skoumal, M. Katona, M. Tóth, L. Balogh und Z. Takáts, 2009. In vivo, in situ tissue analysis using rapid evaporative ionization mass spectrometry. *Angewandte Chemie – International Edition*, **48**, 1–4.
- Schollmeier, M., S. Becker, M. Geißel, K. A. Flippo, A. Blažević, S. A. Gaillard, D. C. Gautier, F. Grüner, K. Harres, M. Kimmel, F. Nürnberg, P. Rambo, U. Schramm, J. Schreiber, J. Schütrumpf, J. Schwarz, N. A. Tahir, B. Atherton, D. Habs, B. M. Hegelich und M. Roth, 2008. Controlled transport and focusing of laser-accelerated protons with miniature magnetic devices. *Physical Review Letters*, **101**, 1–4.
- Schwamborn, K., R. C. Krieg, M. Reska, G. Jakse, R. Knuechel und A. Wellmann, 2007. Identifying prostate carcinoma by MALDI-imaging. *International Journal of Molecular Medicine*, **20**, 155–159.
- Schwartz, S. A., M. L. Reyzer und R. M. Caprioli, 2003. Direct tissue analysis using matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: practical aspects of sample preparation. *Journal of Mass Spectrometry*, **38**, 699–708.
- Scott, C. T. J., C. Kosmidis, W. J. Jia, K. W. D. Ledingham und R. P. Singhal, 1994. Formation of atomic hydrogen in matrix-assisted laser desorption ionization. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **8**, 829–832.

- Seeley, E. H. und R. M. Caprioli, 2008. Imaging mass spectrometry: Towards clinical diagnostics. *Proteomics Clinical Applications*, **2**, 1435–1443.
- Setz, P. D. und R. Knochenmuss, 2005. Exciton mobility and trapping in a MALDI matrix. *Journal of Physical Chemistry, A*, **109**, 4030–4037.
- Seydel, U., B. Lindner, U. Zahringer, E. T. Rietschel, S. Kusumoto und T. Shiba, 1984. Laser desorption mass spectrometry of synthetic lipid a-like compounds. *Biomedical Mass Spectrometry*, **11**, 132–141.
- Shields, W., 1969. Relationships of form and function in neoplastic cells. *Advances in Enzyme Regulation*, **7**, 351–356.
- Shimma, S., Y. Sugiura, T. Hayasaka, Y. Hoshikawa, T. Noda und M. Setou, 2007. MALDI-based imaging mass spectrometry revealed abnormal distribution of phospholipids in colon cancer liver metastasis. *Journal of Chromatography B*, **855**, 98–103.
- Sickler, C. M., G. E. Edwards, O. Kiirats, Z. Gao und W. Loescher, 2007. Response of mannitol-producing arabidopsis thaliana to abiotic stress. *Functional Plant Biology*, **34**, 382–391.
- Siegman, A. E., 1986. *Lasers*. University Science Books, 1. Aufl.
- Sipos, T. und J. R. Merkel, 1970. An effect of calcium ions on the activity, heat stability, and structure of trypsin. *Biochemistry*, **9**, 2766–2775.
- Smit, P., 1968. The relationship between form and function and its influence on ontogenesis and phylogenesis. *Acta Biotheoretica*, **18**, 215–234.
- Sonesson, A. W., T. H. Callisen, U. M. Elofsson und H. Brismar, 2007. Imaging the detergency of single cotton fibers with confocal microscopy: the effect of surfactants and lipases. *Journal of Surfactants and Detergents*, **10**, 211–218.
- Sonntag, S., J. Roth, F. Gaehler und H.-R. Trebin, 2009. Femtosecond laser ablation of aluminium. *Applied Surface Science*, **255**, 9742–9744.
- Spengler, B., 2004. De novo sequencing, peptide composition analysis, and composition-based sequencing: A new strategy employing accurate mass determination by fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **15**, 703–714.
- Spengler, B., U. Bahr, M. Karas und F. Hillenkamp, 1988. Postionization of laser-desorbed organic and inorganic compounds in a time of flight mass spectrometer. *Analytical Instrumentation*, **17**, 173–193.



- Spengler, B., W. Bouschen, D. Kirsch und M. Koestler, 2005. Higher mass accuracy and higher lateral resolution for imaging biological cells. *Vortrag anlässlich der 6. Iglar MS Tage: Perspectives in Mass Spectrometry, Igls Innsbruck, Österreich.*
- Spengler, B. und A. Hester, 2008. Mass-based classification (MBC) of peptides: Highly accurate precursor ion mass values can be used to directly recognize peptide phosphorylation. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **19**, 1808–1812.
- Spengler, B. und M. Hubert, 2002. Scanning microprobe matrix-assisted laser desorption ionization (SMALDI) mass spectrometry: Instrumentation for sub-micrometer resolved LDI and MALDI surface analysis. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **13**, 735–748.
- Spengler, B., M. Hubert und R. Kaufmann, 1994. Ion imaging and confocal microscopy with a new scanning UV-laser microprobe. In *Proceedings of the 42nd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*, S. 1041. The American Society for Mass Spectrometry, Chicago, Illinois.
- Spengler, B., M. Karas, U. Bahr und F. Hillenkamp, 1987. Excimer laser desorption mass spectrometry of biomolecules at 248 and 193 nm. *Journal of Physical Chemistry*, **91**, 6502–6506.
- Spengler, B. und D. Kirsch, 2003. On the formation of initial ion velocities in matrix-assisted laser desorption ionization: Virtual desorption time as an additional parameter describing ion ejection dynamics. *International Journal of Mass Spectrometry*, **226**, 71–83.
- Spengler, B., D. Kirsch und R. Kaufmann, 1991. Metastable decay of peptides and proteins in matrix-assisted laser-desorption mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **5**, 198–202.
- Sprong, H., P. van der Sluijs und G. van Meer, 2001. New insights into glycosphingolipid functionsstorage, lipid rafts, and translocators. *International Review of Cytology*, **2**, 504–513.
- Steimer, K. S. und M. Klagsbrunn, 1981. Serum-free growth of normal and transformed fibroblasts in milk: Differential requirements for fibronectin. *Journal of Cell Biology*, **88**, 294–300.
- Stoeckli, M., D. Staab, M. Staufienbiel, K.-H. Wiederhold und L. Signor, 2002. Molecular imaging of amyloid  $\beta$  peptides in mouse brain sections using mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, **311**, 33–39.

- Stoop, J. M. H., J. D. Williamson und D. M. Pharr, 1996. Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress. *Trends in Plant Science*, **1**, 139–144.
- Strupat, K., M. Karas und F. Hillenkamp, 1991. 2,5-dihydroxybenzoic acid: a new matrix for laser desorption–ionization mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, **111**, 89–102.
- Sugiura, Y. und M. Setou, 2009. Selective imaging of positively charged polar and nonpolar lipids by optimizing matrix solution composition. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **23**, 3269–3278.
- Szabo, I., 1986. New ion-optical devices utilizing oscillatory electric fields. I. principle of operation and analytical theory of multipole devices with two-dimensional electric fields. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, **73**, 197–235.
- Taban, I. M., A. F. M. Altelaar, Y. E. M. van der Burgt, L. A. McDonnell, R. M. A. Heeren, J. Fuchser und G. Baykut, 2007. Imaging of peptides in the rat brain using maldi-fticr mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **18**, 145–151.
- Thermo Electron Corporation, 2003. *Finnigan LTQ – Hardware Manual*. Bremen, Germany, A. Aufl.
- Thermo Electron Corporation, 2004. *Finnigan LTQ FT – Hardware Manual*. Bremen, Germany, 2. Aufl.
- Thermo Electron Corporation, 2006a. *Finnigan LTQ FT Ultra – Getting Started*. Bremen, Germany, 1. Aufl.
- Thermo Electron Corporation, 2006b. *Finnigan LTQ FT Ultra – Hardware Manual*. Bremen, Germany, A. Aufl.
- Thermo Electron Corporation, 2006c. *Finnigan LTQ FT Ultra – Product Specifications*. PS30114\_E 11/06C PS30114\_E 11/06C, PS30114\_E 11/06C, Bremen, Germany.
- Thermo Fisher Scientific, 2009. *Thermo Xcalibur – User Guide*. United States of America, A. Aufl.
- Turney, K. und W. W. Harrison, 2004. Liquid supports for ultraviolet atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption/ionization. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **18**, 629–635.

- Vaeck, L. V. und R. Gijbels, 1990a. Laser microprobe mass spectrometry: potential and limitations for inorganic and organic micro-analysis, Part 1. technique and inorganic applications. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, **337**, 743–754.
- Vaeck, L. V. und R. Gijbels, 1990b. Laser microprobe mass spectrometry: potential and limitations for inorganic and organic micro-analysis, Part 2. organic applications. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, **337**, 755–765.
- van Breemen, R. B., M. Snow und R. J. Cotter, 1983. Time resolved laser desorption mass spectrometry. i. desorption of preformed ions. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics*, **49**, 35–50.
- Vener, A. V., P. J. M. van Kan, A. Gal, B. Andersson und I. Ohad, 1995. Reversible phosphorylation of the signal transduction complex in drosophila photoreceptors. *The Journal of Biological Chemistry*, **270**, 25225–25232.
- Venturolia, M., M. M. Sperotto, M. Kranenburg und B. Smit, 2006. Mesoscopic models of biological membranes. *Physics Reports*, **437**, 1–54.
- Venugopalan, V., 1995. Pulsed laser ablation of tissue: surface vaporization or thermal explosion? *Proceedings of SPIE*, **2391**, 184.
- Verbueken, A. H., F. J. Bruynseels und R. E. V. Griekent, 1985. Laser microprobe mass analysis: A review of applications in the life sciences. *Biomedical Mass Spectrometry*, **12**, 438–463.
- Verhaert, P. D., M. C. P. Conaway, T. M. Pekar und K. Miller, 2007. Neuropeptide imaging on an LTQ with vMALDI source: The complete 'all-in-one' peptidome analysis. *International Journal of Mass Spectrometry*, **260**, 177–184.
- Vertes, A., M. de Wolf und P. Juhasz, 1989. Threshold conditions of plasma ignition in laser mass spectrometry of solids. *Analytical Chemistry*, **61**, 1029–1035.
- Vertes, A., R. Gijbels und R. D. Levine, 1990. Homogeneous bottleneck model of matrix-assisted ultraviolet laser desorption of large molecules. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **4**, 228–233.
- Westmacott, G., W. Ens, F. Hillenkamp, K. Dreisewerd und M. Schürenberg, 2002. The influence of laser fluence on ion yield in matrix-assisted laser

- desorption ionization mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry*, **221**, 67–81.
- Wikipedia-Autor-Unbekannt, 27.04.2008. [http://www.biologie.de/biowiki/bild:cell\\_cycle.png](http://www.biologie.de/biowiki/bild:cell_cycle.png).
- Wilm, M., 2009. Quantitative proteomics in biological research. *Proteomics*, **9**, 4590–4605.
- Yamashita, M. und J. B. Fenn, 1983. Electrospray ion source. another variation on the free-jet theme. *Journal of Physical Chemistry*, **88**, 4451–4459.
- Yang, Y.-H., K. Lee, K.-S. Jang, Y.-G. Kim, S.-H. Park, C.-S. Lee und B.-G. Kim, 2009. Low mass cutoff evasion with  $q_z$  value optimization in ion trap. *Analytical Biochemistry*, **387**, 133–135.
- Zhang, J. und R. Zenobi, 2004. Matrix-dependent cationization in MALDI mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, **39**, 808–816.
- Zhigilei, L. V. und B. J. Garrison, 1997. Velocity distributions of molecules ejected in laser ablation. *Applied Physics Letters*, **71**, 551–553.
- Zhigilei, L. V. und B. J. Garrison, 1998. Velocity distributions of analyte molecules in matrix-assisted laser desorption from computer simulations. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **12**, 1273–1277.
- Zhigilei, L. V. und B. J. Garrison, 2000. Microscopic mechanisms of laser ablation of organic solids in the thermal and stress confinement irradiation regimes. *Journal of Applied Physics*, **88**, 1281–1298.
- Zhigilei, L. V., P. B. S. Kodali und B. J. Garrison, 1997. Molecular dynamics model for laser ablation and desorption of organic solids. *Journal of Physical Chemistry B*, **101**, 2028–2037.
- Zhigilei, L. V., P. B. S. Kodali und B. J. Garrison, 1998. A microscopic view of laser ablation. *Journal of Physical Chemistry B*, **102**, 2845–2853.

## **Danksagung**

Zunächst einmal möchte ich Herrn Prof. Dr. Bernhard Spengler für die Möglichkeit danken, diese Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können. Ebenso danke ich für die damit in Verbindung stehende finanzielle Unterstützung.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Holger Zorn aus dem Institut für Lebensmittelchemie und Lebensmittelbiotechnologie für seine Bereitschaft zur Zweitbegutachtung meiner Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Dieter Kirsch für seine intensive Betreuung während der nahezu gesamten Dissertationszeit. Dies schließt sowohl die fachliche Betreuung, als auch den persönlichen, freundschaftlichen Umgang miteinander ein.

Ebenso möchte ich mich für den stets fruchtbaren fachlichen Diskurs bei Herrn Dr. Arne Leisner und Herrn Oliver Schulz bedanken. Herr Leisner stand auch nach seinem Ausscheiden aus dem Institut, wo möglich, noch helfend zur Seite.

Schließlich möchte ich auch allen Mitarbeitern des Instituts für Anorganische und Analytische Chemie bedanken, mit denen ich erfolgreich zusammengearbeitet habe und die mich fachlich oder persönlich unterstützt haben. Dabei möchte ich besonders Herrn Alfons Hester, Herrn Ralf Sack und Herrn Günter Klossek erwähnen, die mir mit Ihren Fähigkeiten besonders geholfen haben.

Mein freundschaftlicher Dank gilt Carsten Lichtblau, der mir mit seiner Lebensweisheit sehr weiter geholfen hat. Ebenso danke ich Julia Brennecke für Ihre Unterstützung.

Schließlich möchte ich meiner Mutter - einfach für Alles - danken.